

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Cholesterol und der
Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex**

Zur Erlangung des Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diana Mitter

aus Weimar, Thüringen

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Ahnert-Hilger
2. Prof. Dr. med. Hans Bigalke
3. PD Dr. med. Scherübl

Datum der Promotion: 13.01.2003

Das Lied vom Fluss der Dinge

Wie oft Du auch den Fluss ansiehst, der träge
Dahinzieht, nie siehst du dasselbe Wasser
Nie kehrt es, das hinunterfließt, kein Tropfen von ihm
Zu seinem Ursprung zurück.

Beharre nicht auf der Welle,
Die sich an deinem Fuß bricht, solange er
Im Wasser steht, werden sich
Neue Wellen an ihm brechen.

Bertold Brecht

Danksagung

Ich möchte zuerst Frau Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger herzlich danken für ihre weitreichende Unterstützung und engagierte Betreuung während der Erarbeitung dieser Dissertation. Sie war immer für mich erreichbar und förderte meine wissenschaftliche Arbeit in beispielweisender Art. Ich habe unsere Zusammenarbeit als sehr anregend und produktiv erfahren.

Ich danke meinen freundliche Kollegen im Institut für Anatomie der Charité für ihre Geduld und uneingeschränkte Hilfe bei der experimentellen Arbeit. Zu diesen zählen Evelyn Heukendorf, Britta Hinz, Dr. Anja Becher, Dr. Markus Höltje, Sandra Winter und Dr. Thomas Jöns.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen guten Freunden, welche die vorliegende Dissertation gelesen und überaus wertvolle Ratschläge gegeben haben, sowie mich bei meiner Arbeit immer aufgemuntert und unterstützt haben. Zu diesen zählen Helena Zerr, Antje Meseg und Nikolai Axmacher.

Ich bedanke mich auch besonders bei meiner Mutter und meinem Vater, welche die Entstehung dieser Dissertation immer interessiert verfolgt haben und mir in schwierigen Situationen emotional beistanden, und meinem Großvater, welcher besonders zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Publikationen

Artikel

Hinz, B., Becher, A., Mitter, D., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A., Ahnert-Hilger, G. (2001) Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Europ. J. Cell Biol.*, **80**, 615-619.

Mitter, D., Hinz, B., Reisinger, C., Hollmann, S., Yelamanchili, S.V., Treiber-Held, S., Ohm, T.G., Hermann, A., Ahnert-Hilger, G. (2003) The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J. Neurochem.*, **84**, 35-42.

Kongreßbeiträge

Hinz, B., Mitter, D., Becher, A., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A., Ahnert-Hilger, G. (2000) Is the synaptophysin/synaptobrevin-complex relevant for synaptic plasticity? *Xth Magdeburg International neurobiological Symposium: Mechanisms of Learning and Memory*.

Zusammenfassung

Synaptische Vesikel

Synaptophysin

Synaptobrevin

Cholesterol

In der synaptischen Vesikelmembran adulter Neuronen bildet Synaptobrevin mit Synaptophysin den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex. Der Komplex wird im Gegensatz zum SNARE-Komplex nicht in embryonalen Membranen gebildet, sondern erst während der neuronalen Entwicklung hochreguliert. Dabei erfährt Synaptophysin wahrscheinlich eine posttranslationale Modifizierung, die durch einen niedermolekularen Faktor bewirkt wird. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex spielt eine entscheidende Rolle innerhalb der Präsynapse bei der Bereitstellung von Synaptobrevin zur Bindung seiner SNARE-Partner an der Plasmamembran. Im Zustand erhöhter exozytotischer Aktivität der Synapse beschleunigt der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex die Rekrutierung von Synaptobrevin für eine erneute Bildung des SNARE-Komplexes und ermöglicht damit schnelle Exozytose-Endozytose-Zyklen bei erhöhter präsynaptischer Stimulation. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex und der SNARE-Komplex schließen sich gegenseitig aus.

Synaptische Membranen sind aus Lipiden und Proteinen aufgebaut, welche miteinander in Wechselwirkungen stehen. Innerhalb der Membranen formieren sich Subdomänen wie Lipid Rafts die durch eine besondere Lipidzusammensetzung stabilisiert werden und mit speziellen Proteinen bevorzugt assoziieren. Durch die spezielle Organisation des Membranaufbaus können die Prozesse der Endozytose und der Exozytose zum Teil reguliert werden. Synaptische Vesikel, die zu den kleinsten Zellorganellen zählen, zeigen einen besonders hohen membranären Cholesterolgehalt. Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein synaptischer Vesikel und konnte zusätzlich als spezifisch cholesterolbindendes Protein identifiziert werden. Durch die Assoziation mit cholesterolreichen Nanodomänen der synaptischen Vesikelmembran könnten die Funktionen von Synaptophysin bei der Membranstabilisation und im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex der synaptischen Vesikelmembran beeinflusst werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach Cholesterolverminderung der Membranen von CHOp38-Zellen und PC12-Zellen mittels Filipin und Methyl- β -cyclodextrin Synaptophysin in dem Detergens Triton X-100 unlöslich wird. Die Cholesterolverminderung der Membranen von Neuronen aus Rattengehirngewebe und Hippokampuskulturen mittels Methyl- β -

cyclodextrin und Lovastatin führte weiterhin zu einer verminderten Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in der synaptischen Vesikelmembran. Somit scheint die Cholesterolassoziation von Synaptophysin und damit die Organisation der synaptischen Vesikelpoteine innerhalb von Membrandomänen entscheidend an der Regulation der Proteininteraktionen im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex beteiligt zu sein. Zusätzlich trägt Synaptophysin durch seine Cholesterolbindung wahrscheinlich zur Stabilisierung des hohen Krümmungsgrades der Membran der synaptischen Vesikel bei. Die Auswirkungen des verminderten Cholesterolgehaltes auf Synaptophysin und den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex konnten auch bei homozygoten Mausmutanten für die Niemann-Pick Krankheit nachgewiesen werden.

Der Cholesterolgehalt synaptischer Vesikel ist also für die Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes entscheidend und beeinflusst direkt die synaptische Effizienz.

Abstract

small synaptic vesicles

synaptophysin

synaptobrevin

cholesterol

Synaptobrevin interacts with synaptophysin in membranes of adult small synaptic vesicles and forms the synaptophysin/synaptobrevin complex. In contrast to the SNARE complex the synaptophysin/synaptobrevin complex only occurs in adult rat brain but is absent in embryonic brain. Changes in the binding properties of synaptophysin are probably induced by a factor of low molecular weight and correlate with posttranslational modifications of the protein. The synaptophysin/synaptobrevin complex plays an important role within the presynaptic terminal promoting synaptobrevin to bind its SNARE partners at the plasma membrane. In times of increased synaptic activity at the synapse the synaptophysin/synaptobrevin complex accelerates the recruitment of synaptobrevin to form new SNARE complexes and allows for fast exocytotic/endocytotic cycles. The synaptophysin/synaptobrevin complex and the SNARE complex are mutually exclusive.

Major constituents of synaptic membranes are lipids and proteins which are subjected to continuous interactions. Within the membrane form specialized environments known as lipid rafts that are stabilized through tightly packed lipids and proteins that associate preferentially with these domains. The characteristic organisation of membrane structures is crucial for regulating the process of endocytosis and exocytosis. Synaptic vesicles are among the smallest cell organelles and are especially enriched in cholesterol. The integral membrane protein synaptophysin in addition was identified as a major specifically cholesterol-binding protein. Lateral association with cholesterol enriched subunits of the synaptic vesicle membrane may contribute to mediate the functions of synaptophysin in stabilising membrane structures and may in part regulate synaptophysin/synaptobrevin complex formation.

Here we show that depletion of the cholesterol content of CHOp38 cell and PC12 cell membranes by Filipin and Methyl- β -cyclodextrin significantly changes the solubility of synaptophysin in non-ionic detergents like Triton X-100. After cholesterol depletion of adult rat brain and primary cultures of mouse hippocampus by Methyl- β -cyclodextrin and the HMGCoA-reductase inhibitor Lovastatin the synaptophysin/synaptobrevin complex was seen to be downregulated. Thus, the synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on high cholesterol content of the synaptic vesicle membrane. Thereby, synaptophysin likely contributes to stabilise the high membrane curvature of synaptic vesicles. The effects of

cholesterol depletion on functional properties of synaptophysin and the synaptophysin/synaptobrevin complex could also be shown on homozygous littermates of the mouse model of Niemann-Pick type C disease.

Our investigation indicates that the cholesterol content of synaptic vesicles appears to be important for the fusion of the synaptophysin/synaptobrevin complex and directly affects synaptic efficiency.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Synaptische Transmission und Plastizität | 1 |
| 1.2 | Schlüsselproteine der Fusion zwischen sekretorischen synaptischen Vesikeln und der Plasmamembran | 3 |
| 1.2.1 | Synaptobrevin..... | 4 |
| 1.2.2 | Syntaxin..... | 5 |
| 1.2.3 | SNAP 25..... | 5 |
| 1.2.4 | Der SNARE-Komplex..... | 6 |
| 1.3 | Mögliche Modulation der Exozytose | 7 |
| 1.3.1 | Synaptophysin 1..... | 8 |
| 1.3.2 | Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex..... | 9 |
| 1.4 | Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden in der Membran | 10 |
| 1.4.1 | Aufbau von zellulären Membranen..... | 10 |
| 1.4.2 | Neuronale Membranen und Cholesterol..... | 11 |
| 1.4.2.1 | Cholesterol..... | 12 |
| 1.4.2.2 | Interaktionen zwischen Cholesterol und Membranproteinen..... | 12 |
| 1.4.3 | Lipid Rafts als Strukturelement zellulärer Membranen..... | 14 |
| 1.4.4 | Veränderungen im neuronalen Cholesterolmetabolismus - Das Niemann-Pick Modell..... | 15 |
| 1.5 | Fragestellungen | 17 |
| 2 | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Material | 18 |
| 2.1.1 | Antikörper..... | 18 |
| 2.1.1.1 | Primäre Antikörper (monoklonal)..... | 18 |
| 2.1.1.2 | Primäre Antiseren (polyklonal)..... | 18 |
| 2.1.1.3 | Sekundäre Antikörper..... | 18 |
| 2.1.2 | Chemikalien und Reagenzien..... | 18 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen..... | 20 |
| 2.1.4 | Instrumente..... | 23 |
| 2.1.4.1 | Zentrifuge..... | 23 |
| 2.1.4.2 | Zentrifugalfiltereinheiten..... | 24 |
| 2.1.4.3 | Elektrophorese Ausrüstung..... | 24 |
| 2.1.4.4 | Spektrophotometer..... | 24 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2.2 | Methoden | 25 |
| 2.2.1 | Herstellung von Synaptosomen und Synaptischen Vesikeln aus Rattengehirnen..... | 25 |
| 2.2.1.1 | Synaptosomen..... | 25 |
| 2.2.1.2 | Synaptische Vesikel..... | 25 |
| 2.2.2 | Aufbereitung von Zelllinien und primären Zellkulturen..... | 26 |
| 2.2.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 27 |
| 2.2.4 | Extraktion von Membranproteinen..... | 27 |
| 2.2.5 | Immunpräzipitation von Proteinkomplexen..... | 28 |
| 2.2.6 | Chemische Quervernetzung mittels Disuccinimidylsuberat..... | 29 |
| 2.2.7 | Gelelektrophorese..... | 29 |
| 2.2.8 | Western Blot und Immundetektion..... | 31 |
| 2.2.9 | Behandlung von Hippokampuskulturen mit Toxinen..... | 32 |
| 3 | Resultate | 34 |
| 3.1 | Synaptische Proteine und ihre Komplexe in subzellulären Fraktionen adulter und embryonaler Neuronen | 34 |
| 3.1.1 | Verteilung synaptischer Proteine in verschiedenen synaptischen Membranfraktionen aus adulten Rattengehirnen..... | 36 |
| 3.1.2 | Vergleich von synaptischen Membranen adulter und embryonaler Rattengehirne..... | 40 |
| 3.1.3 | Untersuchungen zur Funktion synaptischer Membranproteine nach Blockierung oder Stimulation synaptischer Transmission.... | 40 |
| 3.1.3.1 | Blockade der synaptischen Transmission..... | 40 |
| 3.1.3.2 | Stimulation der synaptischen Transmission..... | 44 |
| 3.2 | Immunpräzipitation von synaptischen Membranproteinen nach Extraktion mit verschiedenen Detergenzien | 46 |
| 3.3 | Einfluss des Cholesterolgehaltes synaptischer Membranen auf Extrahierbarkeit und Interaktion synaptischer Proteine.. | 50 |
| 3.3.1 | Extraktion synaptischer Proteine aus Zelllinien nach Cholesterolverminderung..... | 50 |
| 3.3.1.1 | Inkubation mit Filipin..... | 51 |
| 3.3.1.2 | Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin..... | 53 |
| 3.3.2 | Beeinflussung synaptischer Vesikelproteine nach Veränderung des Cholesterolgehaltes..... | 55 |
| 3.3.2.1 | Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin..... | 55 |
| 3.3.2.2 | Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin und Cholesteroloxidase im Vergleich..... | 59 |
| 3.3.2.3 | Inkubation von hippokampalen Zellkulturen mit Lovastatin..... | 61 |
| 3.3.2.4 | Synaptische Vesikelproteine in Niemann-Pick C1 Mäusen..... | 63 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4 | Diskussion..... | 66 |
| 4.1 | Schlüsselproteine synaptischer Transmission..... | 66 |
| 4.2 | Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex – ein Charakteristikum synaptischer Vesikel in reifen Neuronen.... | 66 |
| 4.3 | Synaptophysin und der Cholesterolgehalt von Membranen.... | 68 |
| 4.3.1 | Cholesterol und seine Funktionen..... | 70 |
| 4.3.2 | Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nach Cholesterolverminderung..... | 71 |
| 4.3.2.1 | Direkter Cholesterolentzug der Membran..... | 72 |
| 4.3.2.2 | Hemmung der Cholesterolbiosynthese..... | 73 |
| 4.3.2.3 | Das Niemann-Pick C1-Mausmodell..... | 73 |
| 4.4 | Assoziation zwischen Synaptophysin und Cholesterol in Nanodomänen auf der Vesikelmembran als Voraussetzung für die Interaktion synaptischer Vesikelproteine..... | 74 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 78 |
| 6 | Lebenslauf..... | 88 |
| 7 | Erklärung an Eides Statt..... | 90 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| α-LTx | alpha-Latrotoxin |
| β-MCD | Methyl- β -cyclodextrin |
| CHOp38-Zellen | <i>chinese hamster ovarien cells</i> |
| CMC | <i>critic micellar concentration</i> |
| DSS | Disuccinimidylsuberat |
| IP | Immunpräzipitat |
| K⁺ | Kalium |
| LC-TeTx | Leichte Kette Tetanusneurotoxin |
| LDCV | <i>large dense core vesicle</i> |
| LTP | <i>long-term potentiation</i> |
| LP1/LP2 | <i>first/second lysate pellet</i> |
| MDCK | <i>Madin-Darby canine kidney cells</i> |
| NSF | N-ethylmaleimide-sensitive factor |
| P2 | Synaptosomensediment |
| PC12-Zellen | Phäochromozytom-Zellen |
| SCAMP | <i>secretory carrier-associated membrane protein</i> |
| SLMV | <i>synaptic like microvesicle</i> |
| SNAPs | <i>soluble NSF attachment proteins</i> |
| SNAP 25 | <i>synaptosomal attachment protein of 25 kDa</i> |
| SNARE | <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor/ SNAP REceptor proteins</i> |
| t-SNARE | <i>target membrane SNARE</i> |
| v-SNARE | <i>vesicle membrane SNARE</i> |
| S/N | Überstand (<i>supernatant</i>) |
| SSV | <i>small synaptic vesicle</i> |
| Syb | Synaptobrevin |
| Syp | Synaptophysin |
| Tab. | Tabelle |
| TeTx | Tetanusneurotoxin |
| TTx | Tetrodotoxin |
| VAMP 2 | <i>vesicle-associated membrane protein 2</i> |

1 Einleitung

1.1 Synaptische Transmission und Plastizität

Das menschliche Gehirn besitzt nach bester Schätzung etwa 10^{11} Neuronen, die ein komplexes Netzwerk zum Informationsaustausch bilden und somit die Grundeinheiten der spezifischen Hirnleistungen darstellen. Die einzelnen Neuronen kommunizieren über Synapsen, wobei jedes Neuron über einige 100 bis zu 200.000 solcher spezialisierten Kontaktpunkte verfügt bzw. mit anderen Zellen aufbaut.

Man unterscheidet zwischen elektrischen und chemischen Synapsen. Elektrische Synapsen repräsentieren elektrische Koppelungen und werden von *gap junctions* gebildet, die aus Connexinmolekülen bestehen. Sie sind charakterisiert durch hohe Transmissionsgeschwindigkeit und relativ stereotype Funktionen. Elektrische Synapsen kommen auch in anderen Geweben des Organismus vor wie z.B. Herzzellen oder glatten Muskelzellen. Im Gehirn sind sie deutlich weniger verbreitet als chemische Synapsen.

An chemischen Synapsen wird Information über die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt und deren nachfolgende Bindung an postsynaptische Rezeptoren übertragen. Chemische Synapsen vermitteln sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Signale und sind an komplexen Funktionsabläufen beteiligt. Sie können Signale amplifizieren und dadurch notwendige Feinabstimmungen während des Informationstransportes durchführen. Langfristige Veränderungen synaptischer Funktionen sind zusätzlich an die Proteinsynthese gebunden. Obwohl die Synapse in weiten Bereichen autonom funktionieren kann, ist besonders für solche Funktionen die Kommunikation mit dem Perikaryon der Nervenzelle notwendig. Die generelle Fähigkeit der Neuronen zur synaptischen Plastizität stellt dabei eine wichtige Voraussetzung für Erinnerungs- und Lernprozesse dar.

Bei der Erregungsübertragung läuft ein Aktionspotential das Axon entlang und erreicht die Synapse. Dort werden u.a. spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, durch die Kalzium in die Zelle einströmen kann. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt die Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt. Hierdurch wird an der postsynaptischen Membran die Entstehung von elektrischen postsynaptischen Potentialen (EPSPs und IPSPs) ausgelöst.

Nach abgeschlossener Exozytose, also der Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und Freisetzung des Vesikelinhaltes, wird die Vesikelmembran wieder von der Plasmamembran durch Endozytose abgeschnürt (Cremona et al., 1997). Die entstandenen Vesikel werden erneut mit Neurotransmittern beladen. In der Membran der synaptischen Vesikel sitzen hierfür spezifische Transportproteine, die Transmitter aus Zytoplasmaspeichern, getrieben

durch einen elektrochemischen Protonengradienten, im Vesikellumen konzentrieren (Edwards et al., 1992, Höltje et al., 2000). Durch die Speicherung von spezifischen Transmittern wird dabei eine selektive Freisetzung uniformer Transmitterpakete während der Exozytose ermöglicht. Der Kreislauf der Vesikelregenerierung kann in der Präsynapse mehrmals wiederholt werden.

Die synaptischen Vesikel innerhalb der Präsynapse teilen sich auf in eine Population sofort freisetzbarer Vesikel, welche bereits an der Plasmamembran angedockt sind, und eine größere Population im Zytoplasma verteilter Vesikel. Im Verlauf der Neurotransmission wird die kleine Population sofort freisetzbarer Vesikel schnell erschöpft und aus der noch nicht mit der Plasmamembran assoziierten Reservepopulation der Synapse ersetzt (Zucker et al., 1996, Wu et al., 1999). *Ribbons*, als submikrometergroße längliche Strukturen unterhalb der Plasmamembran, sind wahrscheinlich für den Transport der Vesikel zur Plasmamembran verantwortlich und für deren dortige Positionierung an aktiven Zonen zur schnelleren Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran (Zenisek et al., 2000).

Die synaptische Aktivität kann im Verlauf von Prozessen des Lernens und Erinnerns stark ansteigen. *Long-term potentiation* (LTP) ist dabei eine Form synaptischer Plastizität, die das Langzeiterinnerungsvermögen initiiert und die Antwortfähigkeit der Synapse auf Signale vergrößert. Die Aktivität der Synapse kann auf verschiedenen Wegen gesteigert werden. Dies kann (i) durch erhöhte Effizienz der postsynaptischen Rezeptoren erreicht werden, z.B. mittels posttranslationaler Modifikation der Rezeptormoleküle kombiniert mit einer eher langfristigen Hochregulation der Rezeptorproteintranslation. (ii) Eine zweite Möglichkeit der synaptischen Aktivitätserhöhung wäre die erhöhte präsynaptische Freisetzung von Transmittern. Die Modulation der Proteininteraktionen auf der Ebene der synaptischen Vesikel könnte hierbei entscheidende Funktionen haben (Janz et al., 1999).

Neben SSVs (*small synaptic vesicles*), die Transmitter mit niedrigem Molekulargewicht speichern, existieren Peptidneurotransmitter speichernde LDCVs (*large dense core vesicles*), die zusätzlich zu kleinen Transmittern wie Noradrenalin, Dopamin oder Serotonin immer ein Peptid oder Protein enthalten. Die Exozytose aller gespeicherten Transmitter wird in Neuronen und neuroendokrinen Zellen stark reguliert. Eine mögliche Unterscheidung zwischen LDCVs und SSVs besteht darin, dass LDCVs nach abgeschlossener Exozytose zum Golgi-Apparat zurückkehren, und nicht wie die SSVs ohne Kontakt zu intermediären Endosomen-ähnlichen Kompartimenten wiederbeladen und erneut verwendet werden können (Murthy und Stevens et al., 1998). SSVs und LDCVs liegen in vielen Neuronen in den Synapsen nebeneinander vor.

Neuroendokrine Zellen sind zur Synthese und Abgabe von Peptidhormonen bzw. von endokrin wirksamen Stoffen befähigt. Gemeinsames Kennzeichen dieser Zellen soll ihre Herkunft aus der Neuralleiste sein. Die Peptidhormone werden in LDCVs gespeichert. Jedoch besitzen neuroendokrine Zellen auch SSV-Analoga, die SLMVs (*synaptic vesicle like microvesicles*). Neuronen, neuroendokrine Zellen u.a. dienen in dieser Arbeit zur Untersuchung synaptischer Prozesse.

1.2 Schlüsselproteine der Fusion zwischen sekretorischen synaptischen Vesikeln und der Plasmamembran

Die Exozytose von Neurotransmittern aus den synaptischen Vesikeln setzt die Verschmelzung der präsynaptischen Plasmamembran mit der synaptischen Vesikelmembran voraus. Diese Membranfusion ist ein streng regulierter Vorgang, der die Interaktion von Proteinen der beiden Membranen beinhaltet. Eine zentrale Rolle spielt dabei der SNARE-Komplex (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex*), durch dessen Bildung die beiden fusionierenden Membranen aneinander geheftet werden. Dem neuronalen SNARE-Komplex ähnliche Komplexe sind für das Andocken von Vesikeln an der Zielmembran auch in vielen anderen intrazellulären Transportwegen eukaryonter Zellen verantwortlich. Er gibt wahrscheinlich für jedes Fusionsereignis einen „spezifischen“ SNARE-Komplex. Im folgenden wird unter SNARE-Komplex immer nur der für die neuronale Transmission verantwortliche verstanden.

Die einzelnen Proteine des SNARE-Komplexes (*Abb. 1*) können in zwei Gruppen unterteilt werden, entsprechend ihrer Lokalisation in den verschiedenen präsynaptischen Membranen. Die Proteine auf der Vesikelmembran, welche mit Synaptobrevin verwandt sind, werden auch als v-SNAREs (*vesicle membrane SNARE*) bezeichnet. Die Proteine auf der Plasmamembran, als Zielmembran während der Exozytose, welche mit Syntaxin und SNAP 25 verwandt sind, werden entsprechend als t-SNAREs (*target membrane SNARE*) bezeichnet. Synaptobrevin, SNAP 25 und Syntaxin fusionieren zum SNARE-Komplex. Durch die hohe Spezifität der Paarbildung wird wahrscheinlich sichergestellt, dass Transportvesikel nur an der „geeigneten“ Zielmembran andocken, was aus der SNARE-Hypothese (Rothman et al., 1994) abgeleitet werden kann.

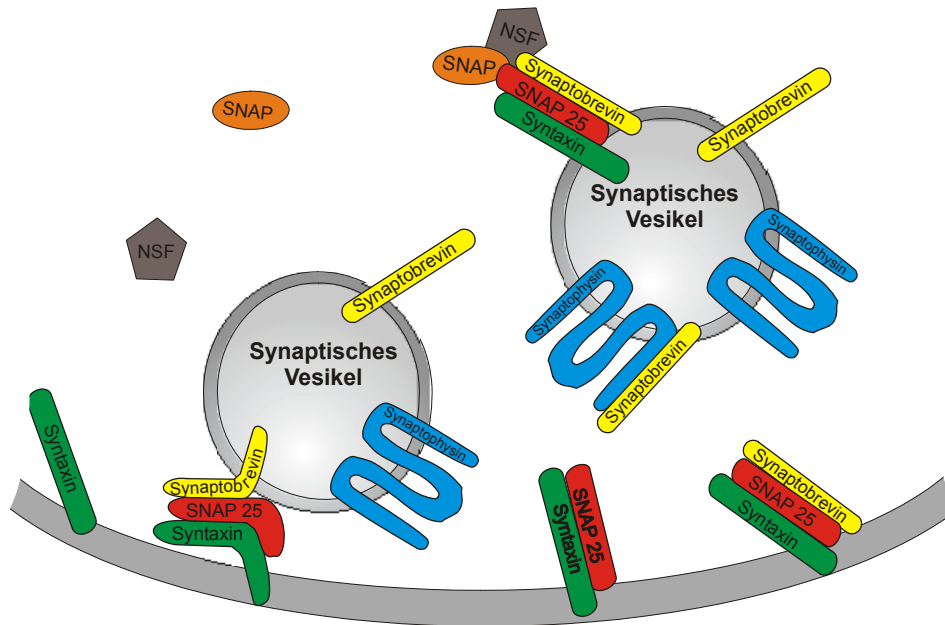


Abb. 1. Schematische Darstellung der synaptischen Proteine des SNARE-Komplexes und des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes. Die synaptischen Vesikel in der Präsynapse fusionieren mit der Plasmamembran unter Bildung eines transmembranären Komplexes aus Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP 25. Synaptobrevin liegt auf der synaptischen Vesikelmembran gleichzeitig gebunden an Synaptophysin vor.

1.2.1 Synaptobrevin

Das hauptsächlich in der Membran der synaptischen Vesikel lokalisierte Synaptobrevin 2 (oder VAMP 2 für *vesicle-associated membrane protein 2*) ist ein kleines 18 kDa Protein mit einer einzigen, die Membran durchspannenden Domäne. Es wurde zuerst im Nervensystem des Zitterrochens entdeckt (Trimble et al., 1988) und konnte in verschiedenen weiteren Spezies kloniert und sequenziert werden (Elferink et al., 1989, Südhof et al., 1989). Synaptobrevin 2 wird in allen Neuronen des Gehirns exprimiert.

Synaptobrevin nimmt mehr als 8 % des Proteinanteils in der synaptischen Vesikelmembran ein. Es liegt zu einem Großteil als Monomer und Dimer vor. Synaptobrevin ist untergliedert in vier Domänen. An einen zytoplasmatischen Prolin-reichen N-Terminus schließt sich ein hochkonservierter hydrophober Kernteil an. Dieser enthält die Bindungsdomäne für die Fusion mit dem SNARE-Komplex. Weiter schließt sich eine kleinere Transmembrandomäne an die mit dem C-Terminus endet.

Es kommen weitere Isoformen des Proteins vor, wie z.B. Synaptobrevin 1 (oder VAMP 1), welches in großer Menge im Rückenmark und weniger auch in den Hirnnervenkernen exprimiert wird, und Cellubrevin, welches in allen Zellen vorkommt und in Neuronen am Recycling von Plasmamembranrezeptoren beteiligt ist (McMahon et al., 1993).

1.2.2 Syntaxin

Syntaxin 1a ist hauptsächlich in der neuronalen Plasmamembran lokalisiert. Es besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa und setzt sich zusammen aus einer transmembranären C-terminalen Domäne und einer zytoplasmatischen Bindungsdomäne am Carboxylterminus, welche auch als H3-Domäne bezeichnet wird. Diese ist notwendig für die Fusion mit dem SNARE-Komplex (Kee et al., 1995).

Syntaxin wurde ursprünglich als retinales Antigen HPC-1 (Barnstable et al., 1985) identifiziert. In den Membranen der Synapse konnten später die zwei Isoformen Syntaxin 1a und Syntaxin 1b kloniert und charakterisiert werden (Bennett et al., 1992, Leveque et al., 1998). Dabei fusioniert nur Syntaxin 1a in den SNARE-Komplex.

1.2.3 SNAP 25

Das 25 kDa große Plasmamembranprotein SNAP 25 (*synaptosomal attachment protein of 25 kDa*) wird ausschliesslich in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert. Es besitzt keine Transmembrandomäne und ist statt dessen in der Membran über eine posttranslationale Fettsäuremodifikation verankert. SNAP 25 enthält zwei Domänen zur Bindung in den SNARE-Komplex. Diese sind über eine schleifenförmige Verbindungsregion verknüpft und können zur Fusion des Proteins in den SNARE-Komplex parallel ausgerichtet werden.

Es wurden bisher die zwei Isoformen SNAP 25a und SNAP 25b identifiziert (Mollinedo und Lazo et al., 1997), welche sich in ihrer Verteilung und Regulierung während der neuronalen Ausreifung unterscheiden. SNAP 23 stellt ein weiteres SNARE-Protein in nicht neuronalem Gewebe dar (Ravichandran et al., 1996).

Sowohl SNAP 25 als auch Syntaxin 1a kommen entlang der gesamten axonalen Membran zum Teil in *clustern* vor (Galli et al., 1995, Garcia et al., 1995) und sind auch auf der synaptischen Vesikelmembran vorhanden (Walch-Solimena et al., 1995, Otto et al., 1997).

1.2.4 Der SNARE-Komplex

Der SNARE-Komplex ist essentiell für die Exozytose. Spezifisches Ausschalten der einzelnen SNARE-Partner mit den clostridialen Neurotoxinen Tetanustoxin und Botulinumtoxin führt zur vollständigen Blockade der synaptischen Transmission. Dabei wirken die leichten Ketten der Toxine als hochspezialisierte Zink-Proteasen und spalten die jeweiligen SNARE-Proteine an definierten Stellen (Niemann et al., 1994, Ahnert und Bigalke et al., 1995).

Der SNARE-Komplex wird aufgebaut aus vier miteinander verdrehten alpha-Helices, wobei je eine Helix von Synaptobrevin und Syntaxin und die anderen zwei Helices von SNAP 25 stammen. Im Komplex sind die Proteine so angeordnet, dass die C-Termini und die

N-Termini nach einer Seite ausgerichtet sind. (Hanson et al., 1997, Lin und Scheller et al., 2000). Synaptobrevin und Syntaxin stecken mit ihrem C-Terminus in der jeweiligen Membran, wodurch ein Membranen-überspannender trans-Komplex entsteht, der das Vesikel der Plasmamembran annähert (Jahn und Südhof et al., 1999, Lin und Scheller et al., 2000).

Die drei SNARE-Proteine können sich spontan zu einem Komplex formieren. Jedes der Proteine kann jedoch auch einzeln an einen der beiden anderen Partner binden, wodurch binäre Komplexe entstehen. Dabei bindet SNAP 25 mit sehr hoher Affinität an Syntaxin (Pevsner et al., 1994, Fasshauer et al., 1997), wohingegen die Bindungsstärke zwischen Syntaxin und Synaptobrevin am geringsten ist. Die H3-Domäne von Syntaxin ist dabei allein ausreichend, um Synaptobrevin zu binden (Calakos et al., 1994, Kee et al., 1995).

Der SNARE-Komplex wird im Verlauf ATP-abhängiger Hydrolyse durch NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*) wieder aufgelöst. NSF, eine zytosolische ATPase, interagiert dabei mit einer Gruppe weiterer Regulationsproteine im Zytosol, den SNAPs (*soluble NSF attachment proteins*). Interessanterweise wurden NSF und die SNAPs zuerst entdeckt, als Voraussetzung für die Bildung des exozytotischen Fusionskomplexes, sodass resultierend die erst später identifizierten Proteinen der Synaptobrevin/Syntaxin/SNAP25-Familien generell als SNARE-Proteine (*SNAP REceptor proteins*) bezeichnet wurden.

Bei der Endozytose der synaptischen Vesikel an der Plasmamembran gelangen einzelne SNARE-Komplexe auch auf die Vesikelmembran (Walch-Solimena et al., 1995; Otto et al., 1997). Sie liegen hier teilweise, wie auch auf der Plasmamembran, in cis-Konfiguration vor (Hinz et al., 2001). Die cis-SNARE-Komplexe sind, im Gegensatz zu den trans-SNARE-Komplexen, vermutlich eine Sackgasse der Fusion, zumindest in schnellen Synapsen mit erhöhtem Endozytose-Exozytose-Durchsatz. Die vesikulären SNARE-Komplexe kommen auf den einzelnen Vesikeln vor und stellen keine Brückenbildung zwischen zusammengelagerten Vesikeln dar (Jahn et al., 1997).

1.3 Mögliche Modulation der Exozytose

Die Interaktion der SNARE-Proteine innerhalb der Präsynapse muss kontrolliert und reguliert werden, um notwendige Feinabstimmungen auf veränderte Anforderungen an die synaptische Aktivität durchführen zu können. Eine entscheidende Funktion könnte hierbei ein anderer Proteinkomplex, der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in der synaptischen Vesikelmembran, übernehmen. Im folgenden soll daher näher auf die beiden Proteine dieses Komplexes und seine möglichen Funktionen in der Präsynapse eingegangen werden.

Synaptobrevin kommt im Gegensatz zu seinen SNARE-Partnern mit einem überwiegenden Anteil in der synaptischen Vesikelmembran vor und geht hier eine weitere Bindung mit

Synaptophysin ein. Synaptophysin reguliert möglicherweise durch die Interaktion im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex die Verfügbarkeit von Synaptobrevin für die Bindung in den SNARE-Komplex während des Andockens der synaptischen Vesikel an der Plasmamembran. Synaptobrevin ist also Bindungspartner in zwei verschiedenen Proteinkomplexen. An Synaptophysin gebundenes Synaptobrevin bindet dabei nicht mehr an Syntaxin und SNAP 25 (Sugita et al., 1999, Martin et al., 2000) und umgekehrt kann Synaptobrevin als Teil des SNARE-Komplexes nicht mit Synaptophysin interagieren (Edelmann et al., 1995), wodurch gezeigt wird, dass sich der SNARE-Komplex und der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex gegenseitig ausschließen.

1.3.1 Synaptophysin 1

Synaptophysin ist ein charakteristisches Membranprotein synaptischer Vesikel. Es wird in enormer Quantität exprimiert (Jahn und Südhof et al., 1989, Leube et al., 1997), doch seine Bedeutung war lange Zeit unklar. Synaptophysin Knock-out-Mäuse sind gesund und zeigen keinen spezifischen Phänotyp (Eshkind und Leube et al., 1995, McMahon et al., 1996), wodurch demonstriert wurde, dass Synaptophysin selbst nicht essentiell ist. Es ist auch möglich, dass die Aufgaben von Synaptophysin durch Synaptophysin-Isoformen wie SCAMPs (*secretory carrier-associated membrane proteins*), Synaptoporin oder Synaptogyrin übernommen werden. In Sehtäbchen, als Neuronen ohne detektierbaren Anteil an Synaptoporin, konnte in Synaptophysin-defizienten Mäusen eine aktivitätsabhängige Veränderung der Anzahl synaptischer Vesikel und ihrer Morphologie nachgewiesen werden (Spiwox-Becker et al., 2001). Elektrophysiologische Untersuchungen von Synaptophysin/Synaptogyrin Doppel-knock-out-Mäusen zeigten eine starke Reduktion von *short-term* und *long-term* Plastizität, womit eine Funktion von Synaptophysin bei plastischen Veränderungen im adulten Gehirn aufgezeigt wurde (Janz et al., 1999). Synaptophysin könnte also in sich entwickelnden und reifen Synapsen innerhalb eines neuronalen Netzwerkes, als essentielles Protein für die Funktion synaptischer Vesikel, eine individuelle Anpassung an erhöhte oder verminderte Transmitterfreisetzung ermöglichen.

Das Molekulargewicht von Synaptophysin beträgt 38 kDa in Neuronen, variiert jedoch in neuroendokrinen Zellen in Abhängigkeit vom Grad der N-Glykosylierung des Moleküls (Leube et al., 1987). Das Protein besitzt vier Transmembrandomänen. Die terminalen Amino- und Carboxylgruppen sind beide zur zytoplasmalen Seite der Vesikel gerichtet, wodurch die zwei Schleifen des Proteins zur luminalen Seite der Vesikel zeigen. Jede dieser Schleifen wird durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert. Der Aminoterminalus ist sehr kurz im Vergleich zu dem Carboxylterminus, welcher zehn Kopien einer glyzerinreichen

Pentapeptidwiederholung trägt, die ähnlich der des Rhodopsins ist (Ovchinnikov et al., 1988). Die meisten antigenen Anteile von Synaptophysin sitzen an diesem Carboxyterminus.

Synaptophysin kommt auf synaptischen Vesikeln in Form von homooligomeren Komplexen vor, welche durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten gebildet werden (Thomas et al., 1988). Durch chemische Quervernetzung in intakten Zellen konnten Komplexe aus bis zu vier Untereinheiten gefunden werden (Johnston et al., 1990).

Synaptophysin assoziiert direkt mit Synaptobrevin und indirekt mit anderen Vesikelproteinen wie z.B. Synaptotagmin 1. Für Synaptophysin und Synaptotagmin 1 in Neuronen und neuroendokrinen Zellen konnten zusätzlich cholesterolassoziierte Regionen nachgewiesen werden, womit Synaptophysin als ein spezifisch cholesterolbindendes Protein in der synaptischen Vesikelmembran charakterisiert wurde (Thiele et al., 2000). Auf die möglichen Funktionen dieser Cholesterolbindung soll in *Kapitel 1.4.2.2* näher eingegangen werden.

1.3.2 Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex ist ein Charakteristikum synaptischer Vesikel in Synapsen ausgereifter Neuronen. Er ist noch nicht nachweisbar in embryonalem Gehirn oder in Synaptophysin-exprimierenden PC12-Zellen, obgleich die einzelnen Proteine Synaptophysin und Synaptobrevin in den Membranen neuronaler SSVs und SSV-Analoga in PC12-Zellen vorhanden sind, und er kann erst nach zwei Wochen Kultivierung in Hippokampuskulturen detektiert werden (Becher et al., 1999).

Möglicherweise sind posttranslationale Modifikationen in reifen Neuronen für die Bindungsfähigkeit von Synaptophysin an Synaptobrevin verantwortlich. Die Art dieser Modifikationen ist noch nicht eindeutig bestimmt. Es konnten jedoch bisher verschiedene Möglichkeiten ausgeschlossen werden. So ist die veränderte Interaktion nicht auf Beeinflussung der Disulfidbrücken oder Glykosylierungsvariabilitäten des Synaptophysins noch auf verschiedene Modifikationen des Synaptobrevins zurückzuführen (Veit et al., 2000). Ein noch nicht genau analysierter niedermolekularer Faktor des synaptosomalen Zytoplasmas kann die Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes induzieren, wobei „nicht-bindendes“ Synaptophysin in „bindendes“ Synaptophysin umgewandelt wird (Becher et al., 1999). Die Interaktion der beiden Proteine ist also abhängig von der Konformation des Synaptophysins. Alle Proteindomänen des Synaptobrevinmoleküls sind dabei für die Bindung an Synaptophysin notwendig.

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex ist nicht essentiell für die Exozytose (Eshkind und Leube et al., 1995, McMahon et al., 1996). Er spielt jedoch eine entscheidende Rolle bei plastischen Umbauvorgängen im adulten Gehirn und steigert wahrscheinlich die Effizienz von Synapsen während der Entwicklung und bei erhöhten Anforderungen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

Die Bindung zwischen Synaptophysin und Synaptobrevin ist wahrscheinlich so gestaltet, dass Synaptobrevin bei Bedarf schnell bereitgestellt werden kann zur Bildung eines trans-SNARE-Komplexes mit den Plasmamembran-ständigen Proteinen SNAP 25 und Syntaxin. Wahrscheinlich verhindert Synaptophysin durch Bindung von freiem extrem reaktivem Synaptobrevin auch dessen mögliche Interaktion mit vesikelassoziierten SNARE-Proteinen und verhindert damit die Bildung zu vieler nicht funktioneller cis-SNARE-Komplexe auf der Vesikelmembran.

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex stellt einen Reservepool an Synaptobrevin bereit, um eine erhöhte Fusionsrate der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran zu ermöglichen. Die Bildung des Komplexes konnte im Epilepsiemodell durch wiederholte Stimulierung zu synaptischer Hyperaktivität gesteigert werden (Hinz et al., 2001).

1.4 Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden in der Membran

Die betrachteten präsynaptischen Proteine sind integrale Membranproteine und liegen damit eingebettet in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen vor. Für das Verständnis der Interaktionen der synaptischen Proteine im SNARE-Komplex und Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex ist es daher wichtig, ihre Wechselwirkungen mit Membranlipiden und ihre Einlagerung in die spezielle Substruktur der Plasmamembran und der synaptischen Vesikelmembran zu kennen.

1.4.1 Aufbau von zellulären Membranen

Der allgemeine Aufbau der neuronalen Membranen entspricht dem Grundprinzip zellulärer Membranen eukaryonter Zellen. Zellmembranen sind dynamische Gebilde, die aus Lipiden und Proteinen zusammengesetzt sind. Dabei ist der spezielle Membranaufbau der einzelnen subzellulären Kompartimente variabel. In den Membranen der Zelle finden ständige Umbauprozesse statt, die aus dem Abschnüren von Membranvesikeln und dem Verschmelzen mit Vesikelmembranen resultieren, wie es z.B. bei der Endozytose und der Exozytose geschieht. Hierfür findet ein ständiges Sortieren und Neuorganisieren der Protein- und Lipidkomponenten innerhalb und zwischen den verschiedenen Membrandomänen statt. Während der Abschnürung von Zellorganellen und Vesikeln von der Plasmamembran

entstehen dabei Membranbereiche, die sich sehr stark in ihrem Lipid-Protein-Verhältnis von der Plasmamembran unterscheiden.

Innerhalb der Membrandoppelschicht werden zwei Formen molekularer Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden beobachtet. (i) Horizontale Interaktionen treten innerhalb der jeweiligen Membranebene zwischen den einzelnen Bestandteilen auf. Dabei interagieren spezifische Membranlipide wie Cholesterol und Sphingolipide mit assoziierten integralen Membranproteinen. (ii) Vertikale Interaktionen treten dagegen zwischen bestimmten Membranbestandteilen und der extrazellulären Matrix bzw. dem subplasmalemmalen Zytoskelett auf. Horizontale und vertikale Interaktionen sind eine Grundlage der Organisation der Membran in Domänen und Subdomänen.

Zwei verschiedene Mechanismen scheinen für das Sortieren von Membranbestandteilen wichtig zu sein (Thiele et al., 2000). Zum einen basiert der Sortierungsprozess auf dem Zusammenspiel zwischen zytosolischen Proteinen und den in der Lipiddoppelschicht verankerten transmembranären Proteinen. Zum anderen wird er reguliert durch Lipid-Lipid-Interaktionen und Lipid-Protein-Interaktionen innerhalb und zwischen verschiedenen Membransubdomänen.

1.4.2 Neuronale Membranen und Cholesterol

Es ist für diese Arbeit wichtig, den Aufbau der neuronalen Plasmamembran im Vergleich zur synaptischen Vesikelmembran zu betrachten, wobei einige entscheidende Unterschiede zu erkennen sind.

Die synaptischen Vesikel zählen mit einem Durchmesser von 35 ± 3 nm (Martin et al., 2000) zu den kleinsten Zellorganellen, wodurch die synaptische Vesikelmembran einen deutlich erhöhten Krümmungsgrad im Vergleich zur Plasmamembran aufweist. Bei gleichem Membrananteil an Sphingomyelin enthält die Membran der synaptischen Vesikel weniger Glykolipide. Besonders auffällig ist jedoch, dass die synaptische Vesikelmembran wesentlich stärker mit Cholesterol angereichert ist als die Plasmamembran (Martin et al., 2000). Die Ursache für die unterschiedliche Lipidverteilung zwischen den Membranen ist unbekannt. Es wäre aber unwahrscheinlich, dass der hohe Cholesterolgehalt allein aus einer großen Anzahl an cholesterolbindenden Proteinen resultiert, da diese dann mehrere hundert Cholesterolmoleküle binden müssten. Daher wird vermutet, dass synaptische Vesikel während der Endozytose aus besonders cholesterolreichen und glykolipidarmen Domänen der Plasmamembran hervorgehen. In der cholesterolreichen Membran der synaptischen Vesikel sitzen wahrscheinlich nicht mehr als 15-20 verschiedene Proteine, während die Plasmamembran ein Mehrfaches an Proteinen enthält.

1.4.2.1 Cholesterol

Cholesterol ist also ein essentieller Bestandteil dieser Membranen und liegt als sehr hydrophobes Molekül innerhalb der Lipiddoppelschicht. Cholesterol ist dabei nicht gleichmäßig in der Membran vorhanden, sondern verteilt sich auf ein Mosaik aus nebeneinander vorliegenden cholesterolreichen und cholesterolarmen Domänen (Liscum und Munn et al., 1999).

Zelluläres Cholesterol wird durch (i) *de novo* Synthese im Endoplasmatischen Retikulum gebildet oder (ii) wird aus dem Extrazellularraum in die Zelle über Endozytose von LDL oder über selektive Aufnahme von freiem oder verestertem Cholesterol aus Lipoproteinen aufgenommen. Der Cholesterolgehalt der Membranen steigt innerhalb der Zelle im sekretorischen Weg vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran kontinuierlich an.

Cholesterol dient hauptsächlich der Aufrechterhaltung der Membranfluidität, stabilisiert jedoch gleichzeitig die Membransubstruktur (Ahmed et al., 1997, Brown et al., 1998). (i) Der Fluidisierungseffekt beruht dabei auf der Veränderung der Membrandynamik. Als *spacer* stören die Cholesterolmoleküle Interaktionen zwischen den Kopfgruppen der Fettsäuren und erhöhen somit die Rotationsmöglichkeiten der Acylketten und deren laterale Mobilität. Bei hoher Cholesterolkonzentration bleibt dadurch die Lipiddoppelschicht über eine große Temperaturspanne in einem flüssigen Zustand. (ii) Der Struktureffekt der Cholesterolmoleküle basiert auf spezifischen molekularen Interaktionen mit anderen membranären Lipidmolekülen. Cholesterol erhöht hierbei die Ordnung der Membran, orientierend an den Acylketten der Lipiddoppelschicht.

1.4.2.2 Interaktionen zwischen Cholesterol und Membranproteinen

Cholesterol interagiert sehr spezifisch mit einzelnen integralen Membranproteinen und bestimmt dadurch deren Funktionen und Interaktionen. Die Kompartimentierung der Membran in cholesterolreiche und cholesterolarme Subdomänen, welche unterschiedlich stark mit Proteinen angereichert sind, trägt dabei entscheidend zur Regulation von Proteininteraktionen während verschiedener Zellprozesse bei. Es wurden bereits verschiedene cholesterolassozierte Proteine in der neuronalen Plasmamembran identifiziert, deren membranäre Anordnung und Funktionen teilweise entscheidend durch ihre Cholesterolbindung gesteuert werden. Dazu zählen u.a. Caveolin und Prominin.

(a) Caveolin ist ein integrales Membranprotein das Cholesterol bindet und dadurch eine entscheidende strukturelle Aufgabe bei der Zusammenlagerung und Stabilisierung spezifischer cholesterolreicher Mikrodomänen in der Plasmamembran, den Caveolae, besitzt

(Simons und Ikonen et al., 1997). Caveolin bindet weiterhin verschiedene Signalrezeptoren und *Second-messenger*-Proteine und könnte spezifisch die Signaltransduktion beeinflussen, zumindest zu einem Teil durch Regulation der verfügbaren Menge an Cholesterol für die Bildung cholesterolreicher Caveolae, und zu einem weiteren Teil indirekt durch Regulation des Cholesteroltransportes vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran (Okamoto et al., 1998, Roy et al., 1999, Incardona et al., 2000). Die cholesterolreichen Transportvesikel mit Caveolin in MDCK-Zellen (*Madin-Darbycanine kidney cells*) entsprechen dabei den synaptischen Vesikeln in Neuronen (Thiele et al., 2000). (b) In neuroepithelialen Zellen wird Prominin im Golgi-Apparat in cholesterolangereicherte Membranmikrodomänen sortiert, um dadurch reguliert zur apikalen Plasmamembran transportiert zu werden, wo es selektiv mit Mikrovilli assoziiert ist (Röper et al., 2000).

Auch einzelne synaptischen Vesikelproteine stehen in enger Beziehung zu dem Cholesterol in der Membran. (c) Für das SNARE-Protein Syntaxin konnte eine direkte Assoziation mit Cholesterol innerhalb der Plasmamembran nachgewiesen werden. Syntaxin liegt zu einem großen Anteil mit SNAP 25 angereichert in spezifischen cholesterolabhängigen Domänen vor, welche Bereiche bilden, an denen synaptische Vesikel bevorzugt andocken und mit der Plasmamembran während der Exozytose fusionieren (Lang et al., 2001). (d) Auch trägt die Cholesterolbindung des synaptischen Vesikelproteins Synaptophysin zu dessen Funktionen innerhalb der Membran entscheidend bei. Es wird vermutet, dass Synaptophysin eine strukturierende Aufgabe bei der Stabilisierung synaptischer Vesikel besitzt. In vergleichbarer Weise funktioniert Peripherin, ein dem Synaptophysin strukturell ähnliches Protein, bei der Aufrechterhaltung stark gekrümmter Regionen in Photorezeptoren (Connell und Molday et al., 1990, Arikawa et al., 1992). Der starke Krümmungsgrad der Vesikelmembran setzt die asymmetrische spezifische Einlagerung von Proteinen und Phospholipiden voraus. So kann Synaptophysin nicht in einer *inside-out* Orientierung in Liposomen eingelagert werden, wobei die terminalen Gruppen zur Lumeninnenseite der Vesikel ausgerichtet wären, anstatt zur zytoplasmalen Seite (Jahn und Südhof et al., 1994).

Synaptophysin scheint weiterhin eine wichtige Rolle bei der Vesikelentstehung während der Endozytose zu besitzen. Wenn neuroendokrine Zellen Synaptophysin exprimieren, wird das Protein in einen neuartigen Vesikeltyp integriert (Leube et al., 1989). Als cholesterolbindendes Protein ist Synaptophysin wahrscheinlich direkt beteiligt an der Organisation von Membransubdomänen innerhalb der Vesikelmembran, die in Abhängigkeit vom Membranvolumen der synaptischen Vesikelmembran als Nanodomänen bezeichnet

werden können. Es könnte dadurch entscheidend zur Beschleunigung der Regenerierung synaptischer Vesikel an der Plasmamembran beitragen (Martin et al., 2000).

1.4.3 Lipid Rafts als Strukturelement zellulärer Membranen

Die Lipidstrukturierung der Membranen in Domänen und Subdomänen, welche ganz spezifisch mit verschiedenen Membranproteinen assoziiert sind, besitzt einen entscheidenden regulierenden Effekt auf die einzelnen Membranprozesse und Proteininteraktionen. Zu den spezialisierten cholesterolreichen Subdomänen zählen Lipid Rafts, die möglicherweise auch die Membran synaptischer Vesikel strukturieren und daher hier genauer betrachtet werden sollen (Ge et al., 1999, Huttner et al., 2000).

Der Gehalt an Lipid Rafts in den verschiedenen Membranen ist variabel und vom Reifegrad der Zellen abhängig. Die Membranen junger Hippokampuskulturen enthalten nur wenige Lipid Rafts, jedoch nimmt der Gehalt an Rafts mit verlängerter Kultivierungsdauer deutlich zu (Brown und London et al., 1998) und korreliert vermutlich direkt mit dem zunehmenden Gehalt der hippokampalen Membranen an Cholesterol und Sphingolipiden (Brown und Rose et al., 1992). Lipid Rafts wurden bisher nur auf der extrazellulären Seite der Membrandoppelschicht eindeutig nachgewiesen, kommen aber wahrscheinlich auch auf der intrazellulären Seite vor. Wie sie innerhalb und zwischen den verschiedenen Membranebenen miteinander kommunizieren, ist noch ungeklärt. Ähnliche Raftstrukturen entstehen vermutlich auch in der synaptischen Vesikelmembran, wenn sich die synaptischen Vesikel von der Plasmamembran abschnüren.

In den verschiedenen Rafts findet eine selektive Rekrutierung spezifischer Proteine bei gleichzeitigem räumlichen Ausschluss anderer Proteine statt. Sie sind daher ideal geeignet zur Regulation der spezifischen Proteinverteilung beim Fusionieren der synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran während der Exozytose und besonders zur Verteilung der verschiedenen Plasmamembranproteine und Vesikelmembranproteine beim Abschnüren der synaptischen Vesikel während der Endozytose.

Vermutlich gibt es multiple, voneinander verschiedene Raft-ähnliche Zusammenlagerungen von Lipiden und Proteinen, welche nebeneinander innerhalb einer biologischen Membran existieren und durch Extraktion mit verschiedenen Detergenzien aus der Membran als DICs (*detergent insoluble complexes*) isoliert und unterschieden werden können (Röper et al., 2000). Bei der Behandlung von Membranen mit milden Detergenzien wie z.B. Triton X-100 ist dabei der größte Anteil der Phospholipide extrahierbar, der größte Anteil der Sphingolipide und des Cholesterols jedoch nicht (Brown und London et al., 1998).

Durch die Extraktion der präsynaptischen Membranen kann besonders auch das Verhalten der einzelnen Proteine des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes und des SNARE-Komplexes sowie deren Anordnung innerhalb von Membransubdomänen untersucht werden. Ein Nachteil der Detergensbehandlung besteht jedoch darin, dass Detergenzien hydrophobe Lipid-Protein-Interaktionen zerstören können. Ist ein Protein, wie z.B. Synaptophysin, in Triton X-100 unlöslich, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass es mit dem Cholesterol u./o. den Sphingolipiden des Lipid Rafts interagiert. Ist ein Protein jedoch komplett löslich in Triton X-100, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein auch mit anderen Membrandomänen horizontal interagiert (Huttner et al., 2000, Röper et al., 2000).

1.4.4 Veränderungen im neuronalen Cholesterolmetabolismus – das Niemann-Pick Modell

Die Cholesterolverteilung innerhalb der verschiedenen Zellen kann resultierend zu pathophysiologischen Veränderungen des gesamten Organismus führen. Es sind bisher verschiedene pathologische Phänotypen mit einem abnormen zellulären Cholesterolmetabolismus bekannt. Durch verminderte cholesterolabhängige Signaltransduktion im Hedghog-Signalweg, welcher an der Differenzierung von neuronalen Geweben während der Entwicklung beteiligt ist, entsteht u.a. eine Holoprosenzephalie (Incardona et al., 2000). Bei Alzheimerpatienten wurden reduzierte Cholesterolmengen in den Zellen beobachtet (Montine et al., 1997). Die Niemann-Pick Krankheit zeigt eine Störung in der neuronalen Cholesterolspeicherung. Als Modell in dieser Arbeit verwendet, sollen die Ursachen und Auswirkungen dieser Krankheit nachfolgend näher beschrieben werden.

Das Niemann-Pick C1 Protein ist in der relativ cholesterolarmen Membran zytoplasmatischer Vesikel nachweisbar, nicht aber auf der Plasmamembran von Nervenzellen (Carstea et al., 1997, Loftus et al., 1997). Das Protein ist aus 13 transmembranären Segmenten aufgebaut und enthält eine SSD (*sterol-sensing domain*). Diese Domäne ist notwendig für die Regulation der Cholesterolhomöostase in der Zelle (Incardona and Eaton et al., 2000) und wurde bisher auf verschiedenen Proteinen gefunden, die teilweise an der Regulation des Cholesterolmetabolismus beteiligt sind. NPC1 transportiert Cholesterol von späten Endosomen zum Golgi-Apparat, wodurch eine Verteilung dieses Cholesterols auch in weitere Zellkompartimente möglich ist. Im Gegensatz zu Lysosomen stellen späte Endosomen damit noch keinen Endpunkt eines zellulären Abbauweges dar (Neufeld et al., 1999).

Die Niemann-Pick Typ C1 Krankheit ist eine autosomal rezessiv vererbare Störung, die durch eine Mutation des NPC1-Gens verursacht wird. Durch die Inaktivierung von NPC1 kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Sphingolipiden und freiem Cholesterol,

welche durch Endozytose von LDL in die Zelle aufgenommen werden. Der Großteil des Cholesterols akkumuliert in den internen Membranschichten multivesikulärer später Endosomen (Mukherjee und Maxfield et al., 1999), weniger in den Lysosomen. Durch die Mutation wird eine generalisierte Veränderung des endozytotischen Membrantransportes verursacht. So ist der Proteintransport in NPC1-Mutanten durch das Kompartiment der späten Endosomen unterbrochen, was bereits für den Mannose-6-phosphat-Rezeptor nachgewiesen wurde (Kobayashi et al., 1999).

Die Beeinflussung des Membrantransportes ist wahrscheinlich eine Konsequenz der spezifischen Veränderung des intrazellulären Cholesteroltransportes, da durch die Akkumulation von Cholesterol in den späten Endosomen in NPC1-mutierten Zellen eine generelle Veränderung der Membranelastizität verursacht wird, wodurch das Ausknospen und Abschnüren von vesikulären Strukturen in der Zelle erschwert wird (Mukherjee und Maxfield et al., 1999). Eine solche Verminderung des Cholesterolgehaltes könnte auch die Funktion synaptischer Vesikel beeinflussen.

1.5 Fragestellungen

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet werden:

1. Wie verändert sich die Extrahierbarkeit durch verschiedene Detergenzien von Synaptophysin als cholesterolbindendem Membranprotein nach Cholesterolverminderung zellulärer Membranen?
2. Zeigt die Interaktion im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex auf synaptischen Vesikeln und das Verhalten der integralen Membranproteine eine Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Vesikelmembran?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primäre Antikörper (monoklonal) gegen:

| | |
|---------------------------|--|
| SNAP 25 | Sternberger Monoclonals (Baltimore, MD, USA) |
| Synaptobrevin 2 (Cl 69.1) | R. Jahn (Göttingen, Deutschland) (Edelmann 1995) |
| Synaptophysin (Cl 7.2) | R. Jahn (Göttingen, Deutschland) (Jahn 1985) |
| Syntaxin (HPC-1) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |

2.1.1.2 Primäre Antiseren (polyklonal) gegen:

| | |
|---------|---|
| Munc 18 | Synaptic Systems (Göttingen, Deutschland) |
|---------|---|

2.1.1.3 Sekundäre Antikörper

| | |
|---|---|
| Pferd anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt | Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) |
| Ziege anti-Hase IgG, Peroxidase-gekoppelt | Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) |

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|--|-------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol Sigma | (St. Louis, MO, USA) |
| Acrylamid Stock-Lösung 30 % | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| BCA (<i>bicinchoninic acid</i>) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| (Natriumbicinchoninate-4,4-Dicarboxy-2,2'-Bichinolin) | |
| BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyle-Phosphat) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Bisacrylamid Stock-Lösung 30 % | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| BSA (Bovines Serumalbumin) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| CHAPS (3-([3-Cholamidopropyl]-Dimethylammonio)-1-Propansulfonat) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Cholesteroxidase | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Cholsäure | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Dimethylformamid (DMF) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |

| | |
|--|--|
| Disucciminidyl suberat (DSS) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| DMEM | Biochrom (Berlin, Deutschland) |
| DNAse 1 | Boehringer Mannheim (Deutschland) |
| ECL TM (enhanced chemiluminescence) | Amersham (Buckinghamshire, UK) |
| EDTA (e thyl e diamin e tetra a cetic a cid) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Eupergit C1Z Kugeln | Roehm Pharma (Weiterstadt, Deutschland) |
| Filipin | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| HAM's | Biochrom (Berlin, Deutschland) |
| HEPES (N-2- H ydroxy e thyl p iperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure) | Sigma (München, Deutschland) |
| Hybond C Nitrozellulosemembran für Westernblots | Amersham (Buckinghamshire, UK) |
| IPTG (I sopropyl- β -D- T hiogalactosid) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Lovastatin | Sigma (München, Deutschland) |
| Lysozym | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| LMW (l ow m olecular w eight marker) | Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |
| Mannitol | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| M ethyl- β -cyclodextrin (β -MCD) | Sigma (München, Deutschland) |
| NBT (N itro b lau T etrazoliumchlorid) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Ni-NTA Superflow (Nickelkügelchen) | Quiagen (Santa Clarita, CA, USA) |
| n- Octyl- β -D-glucopyranosid | ULTROL [®] Grade (Bad Soden, Deutschland) |
| Pipes (P iperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid); 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid) | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Ponceau S | Sigma (St. Louis, MO, USA) |
| Proteaseinhibitoren: | |
| Aprotinin | Boehringer Mannheim (Deutschland) |
| Leupeptin | Boehringer Mannheim (Deutschland) |
| Pepstatin A | Boehringer Mannheim (Deutschland) |
| PMSF (P henyl m ethylsulfonyl f luorid) | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Protein G Sepharose 4 <i>fast flow</i> | Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |
| Roti-Meßkitt zur Bestimmung der Proteinkonzentration | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |

SDS (sodium dodecyl sulfat)

Boehringer Mannheim (Deutschland)

Sphingomyelinase,

Sigma (St. Louis, MO, USA)

Triton X-100

Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Antikörper Lösung

1.5 % Bovines Serumalbumin in TS-Puffer

AP-Puffer

1 ml 1.0 M Tris, pH 9.5

(für Immundetektion auf Western Blots)

1 ml 0.5 M MgCl_2

1 ml 1.5 M NaCl

7 ml H_2O

AP-Entwicklungslösung

50.0 μl NBT (75 mg NBT in 700 μl

(für Immundetektion auf Western Blots)

Dimethylformamid)

37.5 μl BCIP (50 mg BCIP in 1 ml

Dimethylformamid)

Blotto

5.0 % fettarmes Milchpulver

(blocking solution)

0.1 % Tween 20 in TS-Puffer

Cholesteroxidase Stocklösung

200 U/ml Cholesteroxidase

100 mM Pipes

1 M NaCl, pH 6,0

Cholesteroxidase Verdünnungspuffer

140 mM NaCl

4,7 mM KCl

1,2 mM MgSO_4

15 mM Hepes

pH 7,4

1 mU/ml Sphingomyelinase

10 mM Mannitol

| | |
|------------------------------------|---|
| Farbentwicklerlösung | 2 ml 3 mg/ml alpha-Chloronaphthol in DMSO 10 ml TS 10 µl Hydrogenperoxid 30 % |
| Coomassie Blau-Lösung | 1 g Coomassie Brilliantblau R-250 in 0.5 l Methanol und 0.5 l Azetylsäure |
| Dialysepuffer | 120 mM NaCl 20 mM Tris pH 7.4 1,5 % Cholsäure |
| Elektrophoresepuffer (10 X) | 30 g Tris 144 g Glyzin 10 g SDS auf insgesamt 1 l, unter Verwendung von dH ₂ O (keine pH-Anpassung nötig) |
| Extraktionspuffer | 140 mM KCl 20 mM HEPES-KOH, pH 7.3 2 mM EDTA 1 % Triton X-100 |
| Krebs Ringer-Hepes-Puffer | 140.0 mM NaCl 5.0 mM NaHCO ₃ 1.0 mM MgCl ₂ 1.2 mM Na ₂ HPO ₄ 10.0 mM Glukose 20.0 mM Hepes, pH 7.4 |

| | |
|---|--|
| Natriumpuffer | 10.0 mM Glukose 5.0 mM KCl 140.0 mM NaCl 5.0 mM NaHCO ₃ 1.0 mM MgCl ₂ 1.2 mM Na ₂ HPO ₄ 20.0 mM HEPES, pH 7.4 |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline Solution) | 140.0 mM NaCl 2.7 mM KCl 10.0 mM Na ₂ HPO ₄ 1.8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4 |
| Ponceau-Lösung | 0.5 % w/v Ponceau S 3.0 % v/v Trichloroacetessigsäure |
| Probenpuffer Laemmli (3 X) | 12.48 ml Sammelgelpuffer (4 X) 1.50 ml 0.1 M EDTA (Na-Salz) pH 6.8-7.0 15 g Saccharose 5.00 ml 1.5 M DTT auf insgesamt 50 ml, unter Verwendung von dH ₂ O |
| Trenngelpuffer (4 X) | 181.7 g Tris pH 8.8 4.0 g SDS auf insgesamt 1 l, unter Verwendung von dH ₂ O und Filter |
| TS-Puffer (10 X) (Tris-gepufferte Salzlösung) | 20 mM Tris 150 mM NaCl pH 7.5 (mittels HCl) |
| Lösung A (für BCA-Assay) | 1.00 % BCA-Dinatrium 1.70 % NaHCO ₃ 0.16 % Na ₂ -Tartrat 0.40 % NaOH 0.95 % NaHCO ₃ in dH ₂ O, pH 11.25 |
| Lösung B (für BCA-Assay) | 4 % CuSO ₄ *5H ₂ O |

| | |
|---|--|
| Sammelgelpuffer (4 X) | 60.5 g Tris pH 6.8 4.0 g SDS auf insgesamt 1 l, unter Verwendung von dH ₂ O und Filter |
| Saccharoselösung | 0.32 M Saccharose in dH ₂ O |
| Sphingomyelinase Stocklösung | 40 mU/ml Sphingomyelinase 50 % (v/v) Glycerol in PBS |
| Western Blot-Puffer (für halbtrockenen Transfer) | 48 mM Tris 386 mM Glyzin 3.7 g / l 10 % SDS 800 ml H ₂ O 200 ml Methanol (keine pH-Anpassung nötig) |
| Medium für Zellkulturen | DMEM 5 % fetales Kälberserum 10 % Pferdeserum 1 % Glutamin 1 % Penicillin / Streptomycin |
| HAM's und DMEM 1:1 Fertigmedium (Medium für neuronale Primärkulturen) | 10 mM Hepes Putreszin Insulin 0.5 mM Glutamin Fettsäuren (Arachidonsäure) Selenium Progesteron 10 ⁻¹² M Östradiol 10 ⁻⁷ M Corticostron 10 ⁻⁸ M Trijodthyronin Penicillin / Streptomycin |

2.1.4 Instrumente

2.1.4.1 Zentrifugen

Beckman L-70 Ultrazentrifuge Palo Alto, CA, USA

Rotoren: Type 70 Ti
 SW 40 Ti

Beckman Optima™ TL Ultrazentrifuge Palo Alto, CA, USA

Rotor: TLA-100.4

Beckman J2-HS Palo Alto, CA, USA

Rotor: JA-14

Eppendorf Zentrifuge 5402 Hamburg, Deutschland

Eppendorf Zentrifuge 5417 C Hamburg, Deutschland

2.1.4.2 Zentrifugalfiltereinheiten

Centricon-10 Millipore, Bedford, MA, U.S.A.
(Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa)

Centricon-3 Millipore, Bedford, MA, U.S.A.
(Molekulargewichtsgrenze von 3 kDa)

2.1.4.3 Elektrophorese Ausrüstung

Trans-Blot SD halbtrockene Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Elektrophoreseeinheit

Power/Pac 200 power supply Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

Mini-PROTEAN II Elektrophorese Zelle Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

2.1.4.4 Spektrophotometer

Dynatech MR 5000 Elisa-Leser Dynatech (Ashford, United Kingdom)

UV-1202 UV-VIS Spektrophotometer Shimadzu (Kyoto, Japan)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Synaptosomen und Synaptischen Vesikeln aus Rattengehirnen

2.2.1.1 Synaptosomen

Synaptosomen wurden als isolierte freie Nervenendigungen aus Gesamtgehirnen adulter und embryonaler Wistar Ratten nach der Methode von Edelman et al. (1995) hergestellt. Für die Mehrheit der Experimente war die Aufbereitung des Gesamtgehirnes einer adulten Ratte ausreichend bzw. wurden alle 10 bis 18 Embryonen einer schwangeren Ratte am Embryonaltag 20 (E20) verwendet.

Die Ratte wurde mit Ether gut anästhesiert und umgehend dekapitiert. Schnellstmöglich wurde das adulte Gehirn präpariert und in eisgekühlte, mit Wasserstoffperoxid (0.2 %) angereicherte Saccharoselösung (320 mM) gegeben. Die Embryonen schwangerer Ratten wurden auf Eis gebettet, um die embryonalen Gehirne nacheinander freizulegen und in o.g. Saccharoselösung zu sammeln. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, wobei mit adulten und embryonalen Gehirnen gleich verfahren wurde.

Die Rattengehirne wurden in 10 ml Saccharoselösung (320 mM) mit einem Dounce-Homogenisator (9 Hübe bei 900 rpm) homogenisiert in Gegenwart der Proteaseinhibitoren Aprotinin (1 µg/ml), Leupeptin (2 µg/ml), Pepstatin (2 µg/ml) und PMSF (0.2 mM). Anschliessend wurde das Homogenat in der Beckmann-Zentrifuge (Rotor Ti 70) für 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Das daraus resultierende Sediment, welches Zellkerne und nicht lysierte Zellen enthält, wurde verworfen. Der resultierende Überstand (PNÜ=PNS oder *postnuclear supernatant*) wurde erneut für 15 min bei 11.500 rpm zentrifugiert, wodurch man das P₂, eine ungereinigte Synaptosomenfraktion, erhält. Das P₂-Sediment wurde zum Waschen in 10 ml Saccharoselösung mit den Proteaseinhibitoren resuspendiert und erneut für 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert.

2.2.1.2 Synaptische Vesikel

Synaptische Vesikel wurden gewonnen aus dem gewaschenen Synaptosomensediment P₂ gemäß dem Verfahren nach Huttner et al. (1983). Alle Teilschritte wurden bei 4°C ausgeführt.

Das gewaschene Synaptosomensediment P₂ wurde in 1 ml mit Wasserstoffperoxid angereicherter Saccharoselösung aufgenommen und mit 9 ml eiskaltem destillierten Wasser, den o.g. Proteaseinhibitoren (im Verhältnis 1:1000) und Hepes-NaOH-Puffer (10 mM) mit pH 7.0 versetzt. Das Lysat wurde mit dem Dounce-Homogenisator (3 Hübe bei 2000 rpm) homogenisiert und in der Beckmann-Zentrifuge (Rotor Ti 70) für 20 min bei 17.000 rpm zentrifugiert. Daraus resultierte das erste Lysesediment LP₁ (*first lysate pellet*), welches

überwiegend Plasmamembranen enthält. Der zugehörige erste Lyseüberstand LS1 (*first lysate supernatant*) wurde im nächsten Schritt auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und in der Beckmann-Zentrifuge (Rotor TLA 100.4) für 30 min bei 80.000 rpm zentrifugiert. Damit ergab sich ein Sediment ungereinigter synaptischer Vesikel bzw. das zweite Lysesediment LP2 (*second lysate pellet*). Der zugehörige Überstand LS2 entspricht dem Zytosol der lysierten Synaptosomen.

2.2.2 Aufbereitung von Zelllinien und primären Zellkulturen

Membranfraktionen wurden aus der CHO-Zelllinie (*chinese hamster ovarien cell line*) CHOp38, einer mit Synaptophysin (38 kDa) permanent transfizierten CHO-Linie, der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 aus adulten Ratten (Ahnert-Hilger et al., 1992) und von hippokampalen primären Neuronenkulturen gewonnen. Die CHOp38-Kulturen und PC12-Kulturen wurden je nach Versuchsansatz am Tag 3-5 nach Aussaat, die Hippokampuskulturen am Tag 19-23 nach Aussaat verarbeitet.

Das Kulturmedium wurde von den Petrischalen abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem sterilem PBS gespült. Anschliessend wurden die Zellen in je 1 ml sterilem PBS pro Schale (Durchmesser 40 mm bis 800 mm) vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst und entsprechend dem Ansatz in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschliessend wurden die Zellen für 5 min bei 2000 rpm in der Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert. Das resultierende Sediment mit den Zellen konnte für weitere Inkubations- bzw. Experimentieransätze verwendet werden.

Zur Herstellung von Membranen der Zellen wurde das Zellsediment in 200 µl PBS aufgenommen und mit 1.8 ml destilliertem Wasser (Verhältnis 1:9) versetzt. Zusätzlich wurden die Proteaseinhibitoren im Verhältnis 1:1000 und Hepes-NaOH im Verhältnis 1:100 gemäß der LP2-Aufbereitung von Rattengehirnen (*siehe Kapitel 2.2.1*) zugesetzt. Der Ansatz wurde im Dounce-Homogenisator (9 Hübe bei 900 rpm) homogenisiert und in der Tischzentrifuge für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde gemäß dem Experimentierplan auf Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und für 30 min bei 80.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Sediment enthält unter anderem vesikuläre Membranen. Es entspricht in seiner Aufarbeitung dem zweiten Lysesediment von Rattengehirnen.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden gemäß der BCA-Methode (*biocinchoninic acid*) nach Smith et al. (1985) bestimmt. Die Berechnung der Endkonzentration erfolgte anhand einer

Eichkurve, die mit 5 bis 7 doppelt gemessenen BSA-Standardlösungen (*bovine serum albumine*) aufgestellt wurde. Die verwendeten Rinderserum-Albumin-Konzentrationen lagen zwischen 20 µg/ml und 400 µg/ml. Das BSA-Reagenz wurde dabei in PBS gelöst und verdünnt.

Die zu untersuchenden Proben wurden in doppeltem Ansatz 1:50 und 1:100 mit Saccharoselösung (320 mM) verdünnt. In jeweils doppelter Auftragung wurden die BSA-Standardkonzentrationen und Proteinproben in die Schalen einer 96- Schalen-Mikrotiterplatte (je 20 µl pro Schale) pipettiert. Zu jeder Probe wurden 200 µl des BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure-haltige BCA-Lösung A und Kupferionen-haltige BCA-Lösung B im Verhältnis 50:1) gegeben. Die erhaltenen Lösungen wurden für 30 min bei 60°C inkubiert und nach zwei Minuten Abkühlung konnte die Extinktion der Proben im Photometer gemessen werden. Im alkalischen Milieu werden die zweiwertigen Kupferionen durch anwesende Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure einen violetten, bei 550 nm absorbierenden Farbkomplex geben. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mittels der Eichkurve bestimmt.

2.2.4 Extraktion von Membranproteinen

Zur Extraktion wurden die zu untersuchenden Proteine mit Detergenzien aus dem Membranverband herausgelöst. Als Detergenzien wurden Triton X-100, Chaps 1% und n-Octyl-β-D-glucopyranosid 2%, in Extraktionspuffer gelöst, verwendet. Die Probe wurde mit dem jeweiligen Detergens versetzt und die Probensedimente resuspendiert. Die Extraktionsansätze wurden für 1 Stunde bei 4°C geschüttelt.

Zur Abtrennung nicht extrahierbarer Anteile wurden die Proben anschliessend zentrifugiert. Dazu wurden P2-Proben in der Tischzentrifuge für 15 min bei 11.500 rpm, LP1-Proben in der Ultrazentrifuge für 20 min bei 17.000 rpm und LP2-Proben in der Ultrazentrifuge für 30 min bei 80.000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand entspricht dem Extrahierbaren E (Extrakt), das Sediment entspricht dem nicht Extrahierbaren NE (Non-Extrakt). Jeweils ein Teil des Extraktes und des Non-Extraktes wurde in Laemmli-Probenpuffer (Standardprozedur Laemmli et al., 1970) aufgenommen und mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion analysiert oder der Proteinextrakt wurde weiterführend mit der Methode der Immunpräzipitation behandelt (*siehe Kapitel 2.2.5*) und dann als Immunpräzipitat (IP) mit zugehörigem Überstand (S/N) untersucht.

2.2.5 Immunpräzipitation von Proteinkomplexen

Zur Untersuchung von Proteininteraktionen und Komplexbildungen kann die Methode der Immunpräzipitation genutzt werden. Sie wurde von Edelman et al. (1995) erstmals für die Immunpräzipitation des SNARE-Komplexes und des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes aus gereinigten Synaptosomenfraktionen adulter Rattengehirne beschrieben. Das Verfahren ist in gleicher Weise anwendbar auf Experimente mit Fraktionen von ungereinigten Synaptosomen (P2), ungereinigten synaptischen Vesikeln (LP2) und anderen membranhaltigen Proben.

Im ersten Schritt der Immunpräzipitation wurde das Proteinextrakt E hergestellt (*siehe Kapitel 2.2.4*). Im zweiten Schritt wurden jeweils 100 µl des Extraktes mit 1 µl Antikörper versetzt. Wir verwendeten dazu monoklonale Aszites-Antikörper gegen Synaptobrevin (C1 69.1), Synaptophysin (7.2), SNAP 25 (SNAP 25) und Syntaxin (HPC-1). Die Inkubation erfolgte über Nacht (16-18 Stunden) bei 4°C unter ständiger Rotation. Anschliessend wurden zu jeder Probe 20 µl Sepharose-G-Suspension (Sepharose G in Triton X-100 (1% v/v) im Verhältnis 3:1 gelöst) gegeben und erneut für 1 Stunde bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die monoklonalen Antikörper binden an die Sepharose-G-Beads und werden damit aus der Lösung in die Immunpräzipitate (IP) gezogen, indem die Beads in der Tischzentrifuge für 1 min bei 2000 rpm in das Sediment zentrifugiert wurden. Der verbleibende Überstand entspricht dem nicht Präzipitierbaren (S/N). Das resultierende Sediment, welches dem Immunpräzipitat (IP) entspricht, wurde vor der weiteren Verarbeitung dreimal mit Triton-Extraktionspuffer (1% v/v) gewaschen. Immunpräzipitat (IP) und zugehöriger Überstand (S/N) wurden in Laemmli-Probenpuffer (s.o.) aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Westernblot und Immundetektion analysiert.

2.2.6 Chemische Quervernetzung mittels Disucciminidylsuberat

Synaptische Vesikelpoteine wurden mit DSS (**Disucciminidylsuberat**) chemisch quervernetzt. Hierzu wurden nach Aufbereitung der synaptischen Vesikel das Vesikelsediment LP2 in PBS bzw. dem jeweiligen Inkubationsansatz resuspendiert und mit DSS versetzt. Dieser chemische Quervernetzer, in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, wurde mit einer Endkonzentration von 0,5 mM dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach 45min Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris-HCL pH 7.4 (Endkonzentration 100 mM) und nochmaligem Schütteln bei Raumtemperatur für 30 min gestoppt. Danach konnten die Membranen durch Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge für 30 min bei 80.000 rpm sedimentiert werden. Das Pellet wurde in nicht denaturierendem

Laemmli-Probenpuffer, d.h. Probenpuffer ohne Zugabe von DTT, resuspendiert und mittels SDS-PAGE und Immundetektion analysiert.

2.2.7 Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden in einer eindimensionalen Gelelektrophorese nach einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel-System in Gegenwart von 0,1 % SDS (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu wurden die Proteinproben in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf das Gel mindestens eine Minute bei 95°C gekocht, um vorhandene endogene Proteasen zu inaktivieren. Dithiothreitol (DTT) wurde zur Lösung der Proteinproben in Laemmli verwendet, mit Ausnahme der Proben nach chemischer Quervernetzung, um Disulfidbrücken zu spalten. Da der verwendete Quervernetzer DSS benachbarte Membranproteine unter Bildung von Sulfidbindungen verknüpft, wurden diese Proben unter nicht denaturierenden Bedingungen in Laemmli-Probenpuffer ohne Zugabe von DTT gelöst. Das zugesetzte negativ geladene SDS wird durch die Proteine der Probe proportional zu deren Ladung gebunden, und bewirkt die Ausbildung einer identischen Ladungsdichte. Dadurch laufen die Proteine im Gel nicht in Abhängigkeit von ihrer Ladung, sondern von ihrem Gewicht. Proben der Experimente nach chemischer Quervernetzung und Extrakte bzw. Non-Extrakte wurden zusätzlich vor dem Auftragen auf das Gel fünfmal durch eine 23G-Kanüle gezogen.

Das Polyacrylamidgel (*Tab.1*) ist innerhalb des Elektrophoresegerätes aufgebaut aus einem Trenngel (*separating gel*) und einem darüber gesetzten Sammelgel (*stacking gel*). Zur Polymerisierung von Trenn- und Sammelgel wurde Temed (Tetra-methyl-ethylendiamin) und 10 % Ammoniumpersulfat verwendet.

Tab. 1: Zusammensetzung der Gele

| | Sammelgel 3.75 % | Trenngel 12 % |
|---------------------------------|------------------|---------------|
| Tris I (0.5 M Tris, 0.4 % SDS) | 0.5 ml | |
| Tris II (1.5 M Tris, 0.4 % SDS) | | 2.00 ml |
| Acrylamid Stocklösung | 0.25 ml | 3.20 ml |
| Bisacrylamid Stocklösung | 0.1 ml | 1.28 ml |
| H ₂ O | 1.15 ml | 1.52 ml |
| Temed | 2.6 µl | 8 µl |
| Ammoniumpersulfat 10 % | 20 µl | 75 µl |

Die Proteinproben wurden in definierten kleinen Volumina in die einzelnen Geltaschen pipettiert und die jeweiligen Proteine wurden anschliessend elektrophoretisch getrennt. Die Proteine durchlaufen dabei die Gelelektrophorese vertikal in Richtung Anode mit einer angelegten Spannung von 80 V für das Sammelgel und 150-180 V für das Trenngel. In jedem Gel läuft ein LMW-Markerstandard (*low molecular weight marker*) mit, der in den unterschiedlichen Laufhöhen die Molekulargewichte 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 20 kDa und 14 kDa anzeigt. Für das Verfahren wurden 12%ige Gele mit 0.75mm-spacern verwendet. Elektrophoresekammern wurden mit SDS-Elektrophoresepuffer (*running buffer*) gefüllt.

2.2.8 Western Blot und Immundetektion

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden wurden im Western-Blot-Verfahren auf eine Hybond-C-Nitrozellulosemembran übertragen. Dieser Proteintransfer lief in einer Halbfekhtkammer für 20 min bei 0.3 A/Gel unter Verwendung von Semidry Blotpuffer ab.

Das Prinzip der Immundetektion basiert auf der Bindung eines spezifischen Erstantikörpers an die jeweilige Proteinbande auf dem Blotstreifen, die durch Bindung eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers, der gegen den ersten gerichtet ist, sichtbar gemacht wird. Damit können spezifische Proteine in einer Probe nachgewiesen werden.

Die Hybondmembranen wurden nun in TS-Puffer gewaschen und dann in Ponceau-S-Lösung für 1-2 min gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen. So konnten die verschiedenen Banden des LMW-Markers und der aufgetrennten Proben auf der Hybondmembran deutlich sichtbar gemacht werden. An den Markerbanden orientierend wurden Membranstreifen spezifischer Proteingrößen horizontal bzw. vertikal herausgeschnitten, die die zu untersuchenden Proteine trugen.

In der sich anschliessenden Immundetektion wurden die markierten Membranstreifen für 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C in Blotto (*blocking solution*) inkubiert. Die Inkubation der abgesättigten Blotstreifen mit dem ersten Antikörper, in Antikörperlösung aufgenommen, erfolgte nun über Nacht (10-14 Stunden) bei 4°C. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus-AK), in Antikörperlösung aufgenommen, erfolgte bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die einzelnen Blotstreifen viermal für 15 min separat gewaschen. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter kontinuierlichem Schütteln.

Vor der ECL-Entwicklung wurden die Streifen für 5-60 min bei Raumtemperatur in TS-Puffer geschwenkt. Zur Aktivierung der Meerrettich-Peroxidase des zweiten Antikörpers wurden die Blotstreifen in ECL-Lösung für 1 min inkubiert und schnell in der Dunkelkammer einem Film exponiert. Dadurch entstand eine Schwarzfärbung des Filmes an Stellen antikörpermarkierter Proteinbanden. Anschliessend wurden die Proteinbanden der Blotstreifen in Chloronaphthollösung angefärbt und kurz in TS-Puffer gespült.

2.2.9 Behandlung von Hippokampuskulturen mit Toxinen

Zellkulturen hippokampaler Neuronen wurden am Tag 19-23 nach Aussaat im Brutschrank durch Zugabe von Toxinen zum Inkubationsmedium steril 8 und 9 Tage oder unsteril 15 min und 3 Stunden vergiftet bzw. mit Kalium stimuliert. In den Experimentieransätzen wurden die Toxine Tetanusneurotoxin (TeTx), Tetrodotoxin (TTx) und alpha-Latrotoxin (alpha-LTx) verwendet. Dabei wurde Tetanusneurotoxin einmal als leichte Kette des Tetanustoxins LC-TeTx im Vergleich zu der Wirkung des präaktivierten Toxins an permeabilisierten Fraktionen ungereinigter Synaptosomenäquivalente eingesetzt (*siehe Kapitel 2.2.9.1*). In einem weiteren Experiment wurden Hippokampuskulturen für 9 Tage mit 1 nM komplettem Tetanusneurotoxin inkubiert und anschliessend aufbereitet und analysiert. Tetrodotoxin wurde an Hippokampuskulturen im Brutschrank zur 15-min-Stimulation mit einer Konzentration von 400 nM eingesetzt. Hippokampusneuronen wurden im Brutschrank zusätzlich mit 1 nM alpha-Latrotoxin vergleichend zur Wirkung von 25 mM Kalium stimuliert. Die Experimente zur Stimulation der neuronalen Transmission mit Kalium und alpha-Latrotoxin wurden im Unterschied zu den anderen Vergiftungsansätzen unter Verwendung des Probenpuffers Krebs-Ringer-Hepes durchgeführt.

Die in den Petrischalen vergifteten Zellen wurden nach dem Prinzip der Aufbereitung von Zellkulturen (*siehe Kapitel 2.2.2*) weiter behandelt. Das resultierende Zellsediment wurde in je 300-450 ml Triton X-100 1% resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C unter kräftigem Schütteln extrahiert. Zur Trennung extrahierbarer und nicht extrahierbarer Bestandteile wurden die Proben bei 2000 rpm für 2-5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Extrakt wurde durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Synaptobrevin (Cl 69.1), Synaptophysin (7.2) oder Syntaxin (HPC-1) weiter analysiert (*siehe Kapitel 2.2.5*).

In einem weiteren Ansatz zur Vergiftung permeabilisierter Fraktionen von Synaptosomenäquivalenten von hippokampalen Zellen wurden die Zellkulturen zur Isolation der Fraktion des ungereinigten Synaptosomenäquivalentes (*siehe Kapitel 2.2.2*) aufbereitet und die jeweiligen Sedimente wurden in den verschiedenen Probenansätzen in 100 µl PBS aufgenommen.

Zum Permeabilisieren der Zellmembranen, z.B. bei Synaptosomen, wurden die Probenansätze mit 5 µl SLO + DTT (250 mM) versetzt und 10 min auf Eis geschüttelt. Anschliessend wurden die Proben für 10 min bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente enthielten die permeabilisierten Synaptosomenäquivalente und standen für die weitere Toxinbehandlung zur Verfügung. Der jeweilige Überstand wurde verworfen.

Die permeabilisierten Synaptosomenäquivalente wurden mit 100 ng/ml präaktiviertem Tetanusneurotoxin und mit 100 ng/ml der leichten Kette des Tetanusneurotoxin LC-TeTx im Vergleich für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Präaktivierung des Toxins wurden gleiche Mengen an Toxinlösung und 20 mM-Stammlösung DTT angesetzt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach abgeschlossener Vergiftung wurden die Proben für 10 min bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das resultierende Sediment weiter verarbeitet. Die Proteinproben wurden zur Analyse der Proteininteraktionen einem Ansatz zur chemischen Quervernetzung unter Verwendung von DSS unterzogen (*siehe Kapitel 2.2.6*) und mittels SDS-PAGE (*siehe 2.2.7*), Westernblot und Immundetektion (*siehe Kapitel 2.2.8*) analysiert.

3 Resultate

3.1 Synaptische Proteine und ihre Komplexe in subzellulären Fraktionen adulter und embryonaler Neuronen

3.1.1 Verteilung synaptischer Proteine in verschiedenen synaptischen Membranfraktionen aus adulten Rattengehirnen

Die Rohfraktionen von Synaptosomen und synaptischen Vesikeln aus Gehirnen adulter Ratten dienten als Ausgangsmaterial für eine Reihe von Experimenten in dieser Arbeit. Die einzelnen Fraktionen wurden entsprechend der Anleitung zur Aufbereitung ungereinigter Synaptosomen und ungereinigter synaptischer Vesikel (*siehe Kapitel 2.2.1*) gewonnen. Die jeweiligen subzellulären synaptischen Membranfraktionen wurden zunächst auf die membranspezifische Verteilung von Proteinen untersucht. Dabei sollte genauer analysiert werden, ob sich Unterschiede in der Proteinverteilung zwischen den synaptosomalen Membranen und den synaptischen Vesikelmembranen als deren Subfraktion nachweisen lassen.

Zur Überprüfung, in wieweit eine Anreicherung einzelner Proteine im Prozess der subzellulären Fraktionierung erreicht werden konnte, wurde die spezifische Verteilung der unterschiedlichen Proteine und ihrer Komplexe in den Membranfraktionen der verschiedenen Aufreinigungsschritte verglichen. Hierfür wurden die einzelnen Fraktionen im Verfahren der chemischen Quervernetzung analysiert (*Abb. 2*).

Der chemische Quervernetzer Disuccinimidylsuberat (DSS) verknüpft eng benachbarte Proteine in den Membranen. Indem ein Inkubationsansatz für chemisches Quervernetzen keine Extraktion mit Detergenzien erfährt und in nicht denaturierendem Laemmli-Probenpuffer aufgenommen wird, ergibt sich ein sehr genaues, den realen Verhältnissen entsprechendes Bild der intramembranären Proteininteraktionen nach Immundetektion.

In einem längs geschnittenen Blotstreifen einer Probe nach chemischer Quervernetzung von adultem Rattengehirn ist nach Immundetektion mit Antikörpern gegen Synaptobrevin das Synaptobrevinmonomer als 18 kDa-Bande, das Synaptobrevindimer als Bande zwischen 30 kDa und 40 kDa (das kalkulierte Molekulargewicht des Synaptobrevindimer liegt bei 36 kDa) und der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex als Bande zwischen 40 und 60 kDa (das kalkulierte Molekulargewicht liegt bei 56 kDa) darzustellen. Wird der Blotstreifen mit Antikörpern gegen Synaptophysin inkubiert, so ist das Synaptophysinmonomer als 38 kDa-Bande, das Synaptophysindimer als Bande zwischen 67 und 94 kDa und ebenfalls der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex als Bande bei 56 kDa detektierbar.

Synaptobrevin, Synaptophysin und deren Komplexe in Synaptosomen und synaptischen Vesikeln

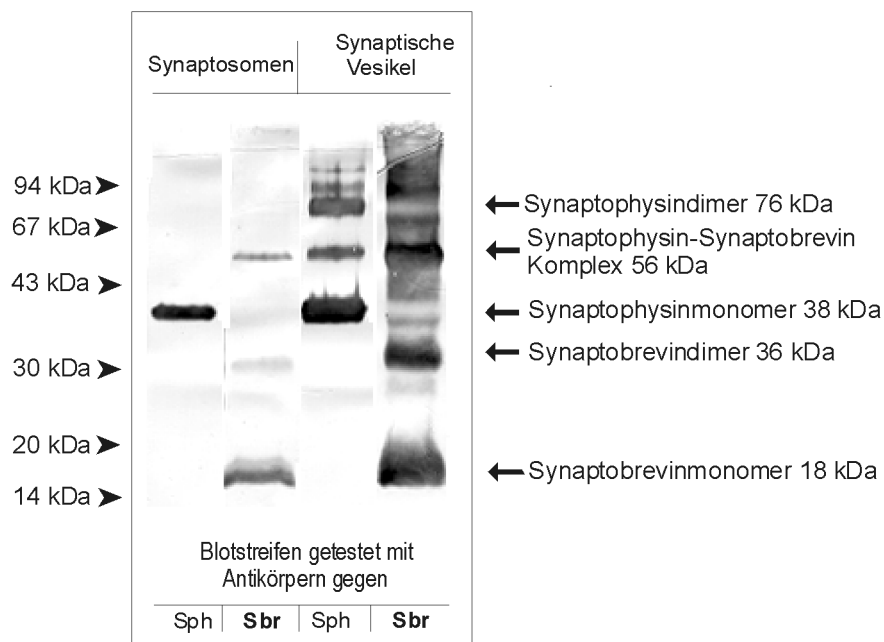


Abb. 2. Proteine der Synaptosomenfraktion P2 und der Fraktion der synaptischen Vesikel LP2 wurden chemisch quervernetzt. Die Membranen wurden sedimentiert und mit SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion mit Antikörpern gegen Synaptophysin und gegen Synaptobrevin im Vergleich analysiert. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen. Die Menge der untersuchten vesikulären Proteine stieg im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge während der Membranaufbereitung deutlich an. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex lässt sich durch Immundetektion mit Synaptobrevinantikörpern besser darstellen als mit Synaptophysinantikörpern.

Dabei ist zu beachten, dass Synaptophysin als Dimer nur nach Darstellung durch DSS-vermittelte chemische Quervernetzung nachweisbar ist. Der Komplex ist mit dem Synaptophysinantikörper jedoch schlechter nachzuweisen als mit dem Synaptobrevinantikörper. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Bindungsstelle des Synaptophysinantikörpers nach Komplexbildung zwischen Synaptophysin und Synaptobrevin in chemisch quervernetzten Proben schlechter zugänglich ist.

Durch die Methode der chemischen Quervernetzung konnte in *Abb. 2* eine Anreicherung der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin als auch eine Zunahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes mit zunehmender Aufreinigung der zellulären Membranen dargestellt werden. Damit stieg im Prozess der subzellulären Fraktionierung synaptischer Vesikel der relative Membrananteil der Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge deutlich an.

Die oben beschriebene Methode für die Isolation von Synaptosomen und synaptischen Vesikeln aus adulten Rattengehirnen (Huttner et al., 1995) konnte in gleicher Weise für die

Aufbereitung embryonaler Rattengehirne verwendet werden und führte zu entsprechenden Ergebnissen (*siehe auch Abb. 3, 4, 13*).

3.1.2 Vergleich von synaptischen Membranen adulter und embryonaler Rattengehirne

Durch das Verfahren der Immunpräzipitation (*siehe Kapitel 2.2.5*) mit Antikörpern gegen Syntaxin oder SNAP 25 kann die Bildung des SNARE-Komplexes auf der Plasmamembran und der synaptischen Vesikelmembran untersucht werden. Für die Immunpräzipitation wurden die einzelnen Proteinfractionen mit dem Detergens Triton X-100 extrahiert und anschliessend mit den jeweiligen Antikörpern immunpräzipitiert (*siehe Kapitel 3.2.1.2*).

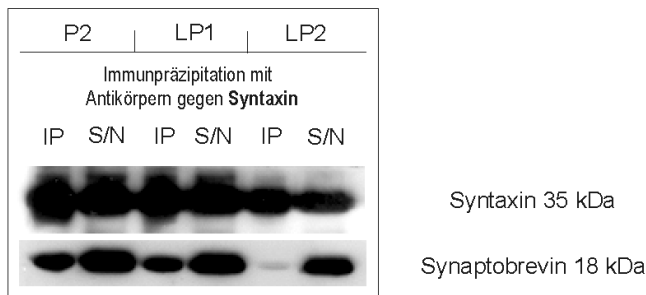
Die Immunpräzipitation wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen Syntaxin und SNAP 25 durchgeführt. Die zugesetzten Antikörper binden an ihre Partnermoleküle im SNARE-Komplex, welche in der Proteinprobe enthalten sind. Werden in einem anschliessenden Schritt alle an Antikörper gebundenen Syntaxin-Moleküle bzw. SNAP25-Moleküle durch Sepharose-G-Beads präzipitiert, kommen auch die jeweils im Komplex gebundenen SNARE-Partner mit in das Immunpräzipitat. Somit bedeutet die Detektion von Synaptobrevin und SNAP 25 im Immunpräzipitat (IP) nach Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Syntaxin (HPC-1) also den Nachweis des SNARE-Komplexes. Das Entsprechende gilt für die Präzipitation mit Antikörpern gegen SNAP 25 (SNAP 25). Nicht präzipitierte Proteine befinden sich im Überstand (S/N).

Die Immunpräzipitation bietet nur eine qualitative Aussage und erlaubt keine Bestimmung absoluter Proteinmengen, da Antikörper nicht immer vollständig präzipitieren. Aus den Ergebnissen lassen sich hauptsächlich Verhältnisangaben über die Bildung von Proteinkomplexen im Vergleich zum Nachweis der einzelnen Proteine in der Probe machen.

Zuerst wurde untersucht, in welchem Ausmaß der exozytotische SNARE-Komplex bereits in embryonalem Rattengehirn ausgebildet ist und sich in den einzelnen Proteinfractionen der synaptischen Vesikel im Vergleich zum adulten Gehirn nachweisen lässt. Hierzu wurden die einzelnen zellulären Subfraktionen, ausgehend von Synaptosomen (P2) bis zur Fraktion synaptischer Vesikel (LP2) im Vergleich zwischen adulten und embryonalen Rattengehirnproben durch das Verfahren der Immunpräzipitation analysiert (*Abb. 3*).

Verteilung des SNARE-Komplexes in subzellulären Membranpräparationen aus adulten und embryonalen Rattengehirnen

3.1 adulte Ratte



3.2 embryonale Ratte

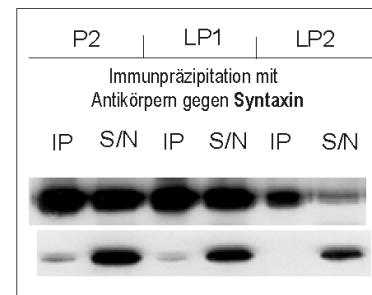


Abb. 3. Synaptische Vesikelfractionen (LP2) wurden schrittweise hergestellt aus homogenisiertem Gesamtgehirn adulter (Abb. 3.1) und embryonaler Ratten (E20) (Abb. 3.2) und mit Antikörpern gegen Syntaxin immunpräzipitiert. Die einzelnen subzellulären Fraktionen (P2, LP1 und LP2) wurden im Vergleich untersucht für die aufgeführten synaptischen Proteine mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion. Es wurden jeweils gleiche Mengen an Protein aufgetragen. Zu beachten ist die deutliche Abnahme der Komplexbildung zwischen Synaptobrevin und Syntaxin mit zunehmender Isolation der synaptischen Vesikelmembranen in adultem als auch in embryonalem Rattengehirn. In embryonalen Vesikelfractionen konnte der Komplex aus Syntaxin und Synaptobrevin nicht mehr nachgewiesen werden. Die Gesamtproteinmenge in embryonalem Rattengehirngewebe war wesentlich geringer als in adultem Gewebe.

Mit zunehmender Aufreinigung der synaptischen Vesikelmembranen nahm der Anteil an den durch Syntaxinantikörper immunpräzipitierbaren SNARE-Bindungspartnern Syntaxin und Synaptobrevin deutlich ab. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass das SNARE-Protein SNAP 25 auch in großer Menge in der Fraktion der ungereinigten synaptischen Vesikel (LP2) vorhanden ist (Becher et al., 1999). Dies ist zum einen auf eine teilweise Kontamination der Proteinfractionen zurückzuführen, wird aber auch durch die Verankerung von SNAP 25 und Syntaxin als Bestandteilen des SNARE-Komplexes in der Membran der synaptischen Vesikel erklärt (Walch-Solimena et al., 1995, Otto et al., 1997). Die SNARE-Proteine SNAP 25 und Syntaxin reakkumulieren nach abgeschlossenem Exozytose-Endozytose-Zyklus mit einem Hauptanteil in der Plasmamembran und zu geringen Anteilen in adultem Gewebe auch auf der synaptischen Vesikelmembran, um für eine erneute Bildung des SNARE-Komplexes in der Plasmamembran wieder aufbereitet zu werden.

In den embryonalen Gehirnproben war die Gesamtproteinmenge im Vergleich zu den adulten Proben deutlich vermindert, jedoch konnten die Bindungspartner des SNARE-Komplexes mit geringer Menge auch in der Fraktion der embryonalen Synaptosomen und im LP1 nachgewiesen werden. In der Fraktion der ungereinigten synaptischen Vesikel LP2 war im gleichen Ansatz kein Bindungskomplex zwischen Syntaxin und Synaptobrevin mehr nachweisbar.

Die Menge synaptischer Proteine im Gesamtgehirn steigt während der Entwicklung deutlich an, was hauptsächlich auf die große Anzahl von post partum gebildeten Synapsen zurückzuführen ist. Nach Untersuchung des unterschiedlichen Proteingehaltes in embryonalen und adulten Fraktionen aus Rattengehirngewebe ergab sich die Frage nach genaueren Unterschieden in den Interaktionen der jeweiligen synaptischen Proteine und ihrer Komplexbildungseigenschaften.

Zur weiteren Untersuchung der SNARE-Proteine wurden Proteinkomplexe aus adulten und embryonalen (E20) ungereinigten Synaptosomenextrakten immunpräzipitiert und im Vergleich analysiert. (*Abb. 4*). Dabei soll eine Gegenüberstellung des SNARE-Komplexes in den beiden neuronalen Entwicklungsstufen nach Immunpräzipitation mit zwei verschiedenen Antikörpern erzielt werden.

In der Kontrolle der Immunpräzipitation (ohne ersten Antikörper) sind keine SNARE-Proteine im Immunpräzipitat (IP) nachweisbar, was die Spezifität des Verfahrens beweist. Auffällig ist erneut (*siehe auch Abb. 3*), dass die Gesamtproteinmenge der embryonalen Proteinfractionen deutlich geringer ist im Vergleich zu den adulten Fraktionen. Der SNARE-Komplex stellt sich gut in den Immunpräzipitaten dar, in gleicher Weise durch Präzipitation mit den verschiedenen spezifischen Antikörpern. Hierbei sind keine Unterschiede zwischen embryonalen und adulten Proben zu erkennen.

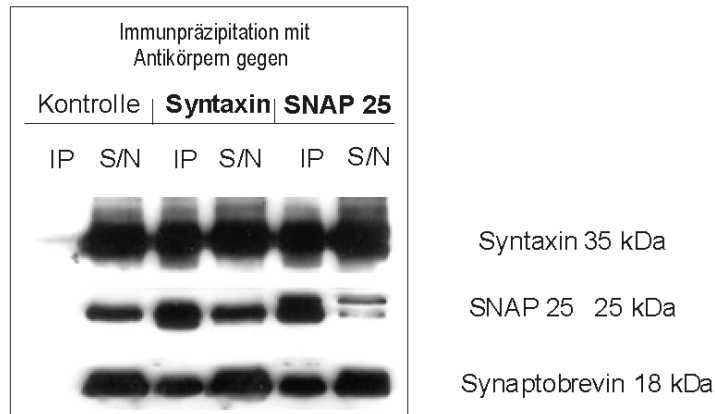
Wird im ersten Schritt der Immunpräzipitation kein proteinspezifischer Antikörper hinzugegeben, können die Proteine der Probe nicht durch Sepharose G sedimentiert werden und sind nur im Überstand der Kontrolle nachweisbar. Dies beweist die hohe Spezifität des Verfahrens der Immunpräzipitation mit den verwendeten monoklonalen Antikörpern.

Wie erwartet konnten die SNARE-Komplex-Bindungspartner deutlich im Immunpräzipitat (IP) der Synaptosomenfraktion adulter Ratten nachgewiesen werden, durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Syntaxin und auch gegen SNAP 25, was den Nachweis des SNARE-Komplexes bedeutet.

Nach der Immunpräzipitation embryonaler Proteinproben wurde eine deutlich geringere Menge an Gesamtproteinen detektiert, die sich aber in ihrer SNARE-Komplexbildung nicht von den adulten Proteinproben unterschieden. Auch hier ließen sich Syntaxin, SNAP 25 und Synaptobrevin als Komplexbildung nachweisen. Während der vesikuläre Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nur in adultem Rattengehirngewebe gebildet wird und nicht in embryonalem Rattengehirn vorhanden ist (Becher et al., 1999), kann der SNARE-Komplex

Der SNARE-Komplex in Synaptosomen aus adulten und embryonalen Rattengehirnen nach Darstellung mit Antikörpern gegen Syntaxin und SNAP 25

4.1 adulte Ratte



4.2 embryonale Ratte

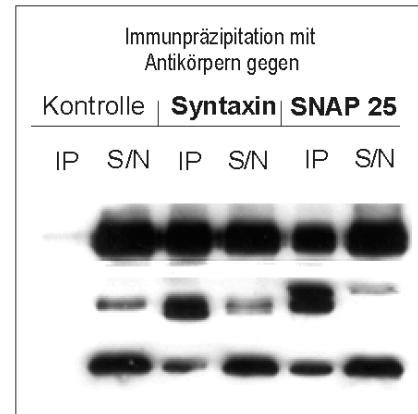


Abb. 4. Adulte (Abb. 4.1) und embryonale (Abb. 4.2) Synaptosomenfraktionen aus Rattengehirngewebe wurden nach Triton X-100-Extraktion mit Antikörpern gegen Syntaxin und SNAP 25 immunpräzipitiert und mittels SDS-Gelelektrophorese, Westernblot und Immundetektion dargestellt.

also bereits vor Abschluss der embryonalen Entwicklung in den synaptosomalen Membranfraktionen nachgewiesen werden. Er ist jedoch in embryonalem Gewebe noch nicht in der Membran der synaptischen Vesikel detektierbar (siehe Abb. 3).

3.1.3 Untersuchungen zur Funktion synaptischer Membranproteine nach Blockierung oder Stimulation synaptischer Transmission

Nach Analyse der synaptischen Proteine und ihrer Komplexbildung innerhalb der Membranen wurden nun weitere Untersuchungen zu deren funktionellen Wechselwirkungen durchgeführt. Dabei sollte genauer untersucht werden, inwieweit der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex auch relevant für kurzfristige plastische Veränderungen in den Neuronen ist und welchen Einfluss eine Blockade bzw. Stimulation der synaptischen Transmission auf den Komplex hat.

3.1.3.1 Blockade der synaptischen Transmission

In hippokampalen Zellkulturen wurde eine Blockade der synaptischen Transmission durch zwei verschieden wirkende Toxine erreicht. Das clostridiale Neurotoxin Tetanustoxin (TeTx) spaltet spezifisch Synaptobrevin innerhalb der Membran, wodurch die Bildung des SNARE-Komplexes und damit die Exozytose blockiert wird. Tetrodotoxin (TTx), das Gift des Kugelfisches, blockiert selektiv den spannungsabhängigen Natriumkanal in der Plasmamembran

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in Synaptosomen nach Vergiftung mit Tetanusneurotoxin TeTx

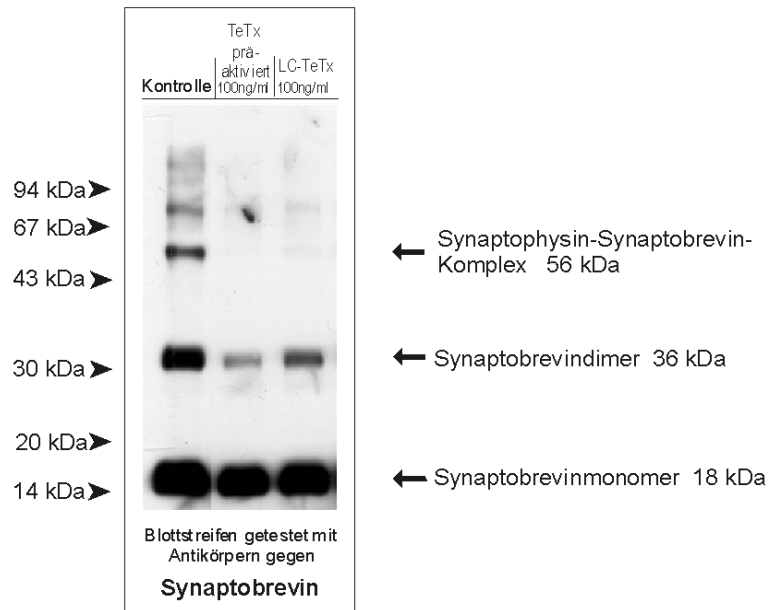


Abb. 5. Ungereinigte Synaptosomenäquivalente adulter Ratten wurden durch Zugabe von SLO permeabilisiert und als Sedimente mit 100 ng/ml präaktiviertem TeTx bzw. mit 100 ng/ml LC-TeTx für 30 min inkubiert. Anschliessend wurden die Proben chemisch quervernetzt und analysiert.

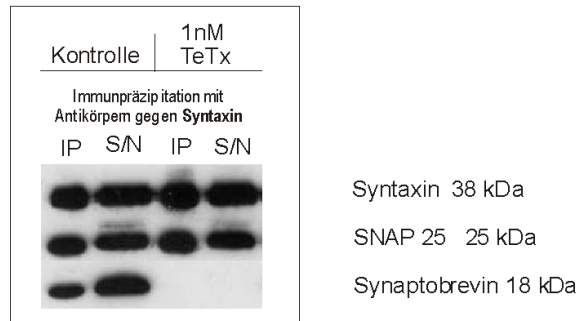
neuronaler Zellen und verhindert damit die Weiterleitung von Impulsen entlang des Axons und an erregbaren Membranen von Nervenfasern.

Die Wirkung der Tetanusneurotoxin auf die synaptischen Vesikelpoteine wurde durch chemische Quervernetzung der membranständigen Proteine nach kurzzeitiger Vergiftung (30 min) analysiert (Abb. 5). Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex war nach Einwirkung von Tetanusneurotoxin nicht mehr nachweisbar. Die Menge an Synaptobrevindimeren nahm ebenfalls durch die Toxineinwirkung deutlich ab. Zu beachten ist die kaum veränderte Menge an detektierbaren singulären Synaptobrevinmolekülen.

Dafür wurden im Vergleich permeabilisierte Synaptosomen mit präaktiviertem Tetanusneurotoxin und der leichten Kette des Tetanusneurotoxin LC-TeTx vergiftet. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex kann hier nach Spaltung von Synaptobrevin durch chemische Quervernetzung nicht mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich ist die Menge an detektierbaren Synaptobrevindimeren nach Vergiftung deutlich vermindert, während im Vergleich zur Kontrolle die Synaptobrevinmonomere nur leicht vermindert waren.

Der SNARE-Komplex und der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in Neuronen nach Langzeitvergiftung mit Tetanustoxin TeTx

6.1



6.2

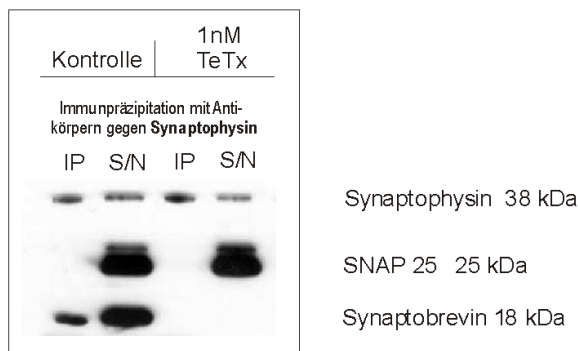


Abb. 6. Hippokampale Zellkulturen wurden nach Zugabe von 1 nM Tetanusneurotoxin zum Kulturmedium für 9 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschliessend wurden die Zellkulturen aufbereitet und mit Antikörpern gegen Syntaxin (Abb. 6.1) und Synaptophysin (Abb. 6.2) immunpräzipitiert und dargestellt. Durch Immunpräzipitation mit Syntaxinantikörpern war in der Kontrolle der SNARE-Komplex gut darstellbar. Nach Vergiftung mit Tetanusneurotoxin verschwand Synaptobrevin in den hippokampalen Zellen und konnte weder im Immunpräzipitat (IP) noch im Überstand (S/N) nachgewiesen werden (Abb. 6.1). Nach Vergiftung verschwindet auch der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex und ist durch Immunpräzipitation mit Synaptophysinantikörpern nur in der Kontrolle nachweisbar.

In Hippokampuskulturen kann nach 9 Tagen Vergiftung mit Tetanustoxin durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Syntaxin kein Synaptobrevin im Immunpräzipitat (IP) und im zugehörigen Überstand (S/N) mehr detektiert werden (Abb. 6.1). Das nach Vergiftung gesplattene Synaptobrevin liegt also auch nicht mehr gebunden an seine SNARE-Partner in der Membran vor.

Die Spaltung von Synaptobrevin scheint jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die Komplexierung von Syntaxin und SNAP 25 zu haben, da sich für diese Proteine keine Veränderungen in der Detektierbarkeit ergaben.

Durch Immunpräzipitation mit Synaptophysinantikörpern kann nach 9-Tage-Vergiftung mit Tetanustoxin ebenso der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in der Probe nicht mehr

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nach Vergiftung mit Tetrodotoxin TTx

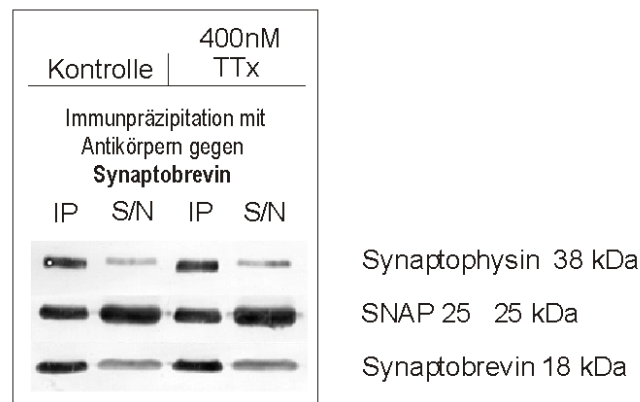


Abb. 7. Hippokampale Zellkulturen wurden unter Zugabe von 400 nM Tetrodotoxin zum Kulturmedium für 15 min im Brutschrank inkubiert und anschliessend mit Synaptobrevinantikörpern immunpräzipitiert. Die Proben wurden sedimentiert und mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion analysiert. Nach der Behandlung blieb der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex unverändert nachweisbar. Es ergaben sich keine auffälligen Veränderungen der detektierten Proteine.

nachgewiesen werden (*Abb. 6.2*). Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen nach chemischer Quervernetzung der synaptischen Vesikelproteine in Synaptosomen (*siehe Abb. 5*).

Durch die Vergiftung nimmt die Menge des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes auf den vesikulären Membranen ab. Wahrscheinlich wird das Synaptobrevin, welches im Komplex mit Synaptophysin vorliegt, und nicht das freie Synaptobrevin bevorzugt durch Tetanustoxin gespalten wird.

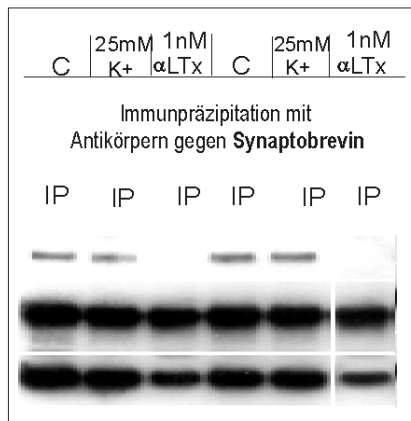
Hippokampale Zellkulturen wurden für 15 min im Brutschrank mit 400 nM Tetrodotoxin vergiftet und anschliessend mittels Immunpräzipitation mit Synaptobrevinantikörpern analysiert. Nach dieser kurzzeitigen Vergiftung der Kulturen konnten keine Auswirkungen auf den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nachgewiesen werden. Ebenso sind keine Veränderungen des Binärkomplexes zwischen Synaptobrevin und SNAP 25 zu erkennen (*Abb. 7*).

3.1.3.2 Stimulation der synaptischen Transmission

Es wurde nun weiter untersucht, ob eine kurzfristige Stimulation der Exozytose zu einer transienten Veränderung der Interaktion der beiden Proteine führte. Hierzu wurden hippokampale Zellkulturen mit alpha-Latrotoxin (alpha-LTx) im Vergleich zu Kalium behandelt. Das Gift der Schwarzen Witwe, alpha-Latrotoxin, führt an der präsynaptischen

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nach Stimulation mit alpha-Latrotoxin und erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration in Hippokampuskulturen

8.1 Immunpräzipitation



Synaptophysin 38 kDa

SNAP 25 25 kDa

Synaptobrevin 18 kDa

8.2 Überstände

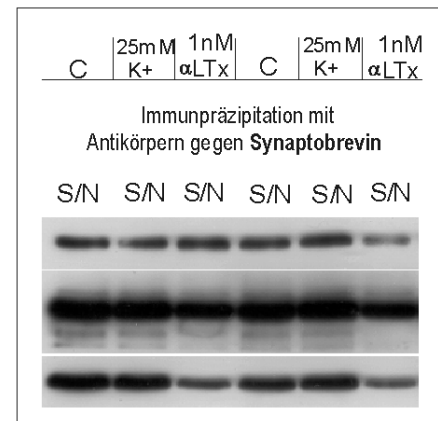


Abb. 8. Hippokampale Zellkulturen wurden nach Zugabe von 1 nM alpha-Latrotoxin oder 25 mM Kalium in Krebs-Ringer-Hepes-Puffer für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschliessend aufbereitet. Die Proben wurden mit Antikörpern gegen Synaptobrevin immunpräzipitiert, sedimentiert und zur Darstellung gebracht. Die Untersuchung ergab bei mehrmaliger Wiederholung immer das gleiche Ergebnis. Nach 3 Stunden Inkubation mit alpha-Latrotoxin konnte kein Synaptophysin mehr im Immunpräzipitat (IP) detektiert werden, obwohl das Protein in der Probe im Überstand (S/N) vorhanden war. Durch die Wirkung von alpha-Latrotoxin wurde der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in den Zellkulturen aufgebraucht. Die Bindung von SNAP 25 an Synaptobrevin schien durch die Wirkung von alpha-Latrotoxin nicht beeinflusst. Nach Stimulation mit Kalium ergaben sich keine sichtbaren Veränderungen der Proteininteraktionen in den Proben.

Nervenendigung zu einer massiven Transmitterfreisetzung (Frontali et al., 1976), wobei durch Bindung an Rezeptoren auf der präsynaptischen Plasmamembran nichtselektive Ionenströme ausgelöst werden (Wanke et al., 1986, Hurlbut et al., 1994). Zusätzlich unterbricht alpha-Latrotoxin das Recycling der synaptischen Vesikel.

Im Gegensatz zu alpha-Latrotoxin verursacht Kalium auf andere Weise eine synaptische Stimulation. Die normale extrazelluläre Kaliumkonzentration beträgt 4 mmol/l und steht einer intrazellulären Kaliumkonzentration von 155 mmol/l gegenüber. Die Zufuhr von extrazellulärem Kalium bewirkt einen Zusammenbruch des Konzentrationsgradienten an der Plasmamembran und führt zu einer beträchtlichen Depolarisation der Nervenzelle. Diese Depolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle in der Membran und leitet damit den Prozess der Membranfusion ein.

Hippokampusneuronen wurden für 3 Stunden im Brutschrank mit 1 nM alpha-Latrotoxin im Vergleich zur Wirkung von 25 mM Kalium kurzzeitig stimuliert. Nach Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Synaptobrevin war der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in den durch alpha-Latrotoxin stimulierten Proben nicht mehr

nachweisbar (*Abb. 8.1*), wobei die beiden Vesikelproteine im Überstand gut detektierbar waren (*Abb. 8.2*). Bei exzessiv gesteigerter synaptischer Transmission fusioniert wahrscheinlich der größte Anteil des im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex bereitgestellten Synaptobrevins mit seinen SNARE-Partnern in der Plasmamembran. Da nun der überwiegende Teil von Synaptobrevin gebunden im SNARE-Komplex vorliegt, sind die Synaptophysinmoleküle in der Vesikelmembran als nicht komplexierte freie Proteine in Monomer- und Dimerform nachweisbar.

In der hier durchgeführten Immunpräzipitation konnten keine eindeutigen Auswirkungen auf das Verhalten von SNAP 25 gefunden werden. In weiterführenden Experimenten zur Kurzzeitstimulation mit alpha-Latrotoxin (*nicht abgebildet*) konnte die zu erwartende Zunahme des SNARE-Komplexes in der Synapse auch nachgewiesen werden.

Die 3-Stunden-Stimulation mit 25 mM Kalium wurde im gleichen Experiment durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Synaptobrevin untersucht. Die durch extrazelluläres Kalium verursachte Depolarisation der Zellen führte zu keinen erkennbaren Veränderungen in den Proteininteraktionen (*Abb. 8*). Wahrscheinlich gelangt nach Kaliumstimulation, anders als nach alpha-Latrotoxin-Stimulation, nur ein kleinerer Teil der synaptischen Vesikel zur Exozytose.

3.2 Immunpräzipitation von synaptischen Membranproteinen nach Extraktion mit verschiedenen Detergenzien

Biochemische Analysen zur Komplexbildung von Membranproteinen können unter Verwendung der Methode der Extraktion durchgeführt werden. Dabei wird die Löslichkeit der verschiedenen Membranproteine in nicht denaturierenden Detergenzien analysiert. Durch Vergleich der Extraktion mit ionischen und nicht ionischen Detergenzien können Aussagen über das Löslichkeitsverhalten von Proteinen in unterschiedlichen spezifischen Membransubdomänen getroffen werden, besonders in Bezug auf ihre Assoziation mit detergensresistenten Lipid Rafts (Huttner et al., 2000, Röper et al., 2000).

Im Folgenden wurde untersucht, in welchem Maß die Extrahierbarkeit der in dieser Arbeit untersuchten synaptischen Proteine von der Verwendung ionischer und nicht ionischer Detergenzien abhängig ist.

Die Extraktion der Proteinproben vor Immunpräzipitation ist notwendig, um die in den zellulären Membranen verankerten Proteine herauszulösen und der freien Bindung an zugeführte Antikörper zugänglich zu machen. Da hierbei das membranäre Milieu verändert wird, kann kein so genaues Bild von der ursprünglichen Anordnung der Proteine in den

verschiedenen Membranen gegeben werden, wie es nach chemischer Quervernetzung möglich ist.

Nach Extraktion der Membranen mit anschliessender Zentrifugation ergeben sich zwei Fraktionen, (i) das Extrakt (E), welches die im Detergens gelösten Proteine enthält, und (ii) das Non-Extrakt (NE), in welchem sich die restlichen Bestandteile der Probe befinden. Zur anschliessenden Immunpräzipitation wurde ausschliesslich das Extrakt verwendet. Im Immunpräzipitat (IP) finden sich nur Proteine, die im Detergens extrahierbar sind und durch die zugesetzten Antikörper gebunden wurden. Die Antikörper präzipitieren jedoch nicht vollständig. Im zugehörigen Überstand (S/N) befinden sich daher neben extrahierbaren aber nicht immunpräzipitierbaren Proteinen auch Proteine, die immunpräzipitierbar sind, aber nicht durch Antikörper gebunden wurden.

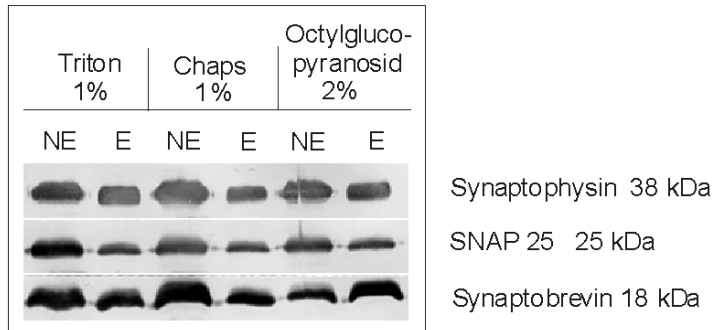
Zur Untersuchung der Extrahierbarkeit von Synaptophysin, als synaptischem Vesikelprotein, und SNAP 25 bzw. Synaptobrevin, als Plasmamembranproteinen, wurden ungereinigte synaptische Vesikelmembranen adulter Rattengehirne mit dem zwitterionischen Detergens Chaps und im Vergleich mit den zwei nicht ionischen Detergenzien Triton X-100 und n-Octyl- β -D-glucopyranosid behandelt, die sich deutlich in ihrer kritischen Mizellenkonzentration (CMC) voneinander unterscheiden (*Tab. 2*).

Tab. 2. Detergenzien und ihre Eigenschaften

| | Triton X-100 1% | Chaps 1% | n-Octyl-β-D-glucopyranosid 2% |
|------------------------------------|------------------------|-----------------|---|
| CMC | 200-900 μ M | 6-10 mM | 20-25 mM |
| Ionität | nicht ionisch | zwitterionisch | nicht ionisch |
| Molekulargewicht | 650.0 | 614.9 | 292.4 |
| HLB (hydrophile-lipophile Balance) | 13.5 | | 12.6 |
| eingesetzte Molarität | 15.4 mM | 16 mM | 68 mM |

Verwendung unterschiedlicher Detergenzien bei der Extraktion und anschliessenden Immunpräzipitation synaptischer Vesikel

9.1 Extraktion



9.2 Immunpräzipitation

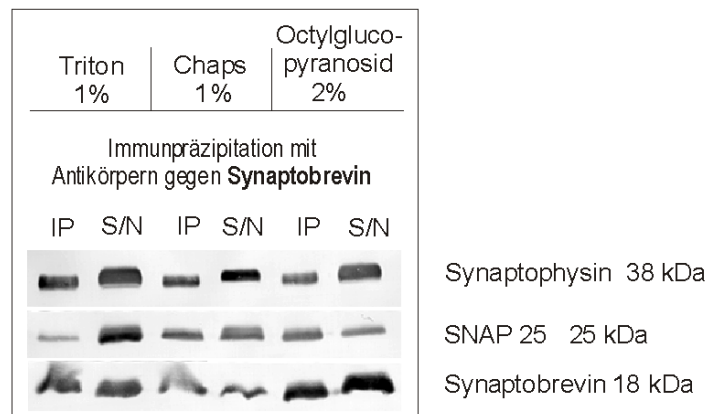


Abb. 9. Synaptische Vesikelfractionen adulter Rattengehirne wurden mit den jeweiligen Extraktionspuffern für eine Stunde auf Eis extrahiert. Das resultierende Extrakt (E) und das Non-Extrakt (NE) wurden im Vergleich dargestellt. Der Extrakt wurde in einem zweiten Ansatz mit Synaptobrevinantikörpern präzipitiert und dann als Immunpräzipitat (IP) mit zugehörigem Überstand (S/N) analysiert und dargestellt. Nach der Detergenzienbehandlung konnten die synaptischen Proteine Synaptophysin, Synaptobrevin und SNAP 25 jeweils im Extrakt und im Non-Extrakt zu gleichen Verhältnissen detektiert werden. Durch die Verwendung der unterschiedlichen Detergenzien ergaben sich keine Veränderungen im Löslichkeitsverhalten der Proteine. In der anschliessenden Immunpräzipitation konnten für alle drei verschiedenen Detergenzien der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex als auch Synaptobrevin im Komplex mit SNAP 25 nachgewiesen werden. Die Komplexbildung der Proteine blieb bei Verwendung der unterschiedlichen Detergenzien unbeeinflusst.

Durch die Behandlung der synaptischen Vesikelmembranen mit unterschiedlichen Detergenzien ergaben sich keine sichtbaren Unterschiede in der Extrahierbarkeit der synaptischen Proteine (Abb. 9.1). Sowohl Synaptophysin, als auch SNAP 25 und Synaptobrevin konnten im Extrakt und im Non-Extrakt deutlich detektiert werden. Dabei konnte durch Verwendung der Detergenzien Chaps und n-Octyl- β -D-glucopyranosid keine Veränderung des Löslichkeitsverhaltens der Proteine im Vergleich zu Triton X-100 gefunden werden.

In der anschliessenden Immunpräzipitation konnten für alle drei verschiedenen Detergenzien der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex und SNAP 25 mit Synaptobrevin im Komplex auf der synaptischen Vesikelmembran nachgewiesen werden. Die Komplexbildung der Proteine blieb durch die Verwendung der unterschiedlichen Detergenzien unbeeinflusst (*Abb. 9.2*).

Basierend auf der Feststellung, dass sich keine Unterschiede in der Extrahierbarkeit und der Komplexbildung der untersuchten Proteine durch Verwendung der verschiedenen Detergenzien ergaben, wurde für die weiteren Experimente dieser Arbeit Triton X-100 in 1%iger Lösung als Detergens verwendet.

3.3 Einfluss des Cholesterolgehaltes synaptischer Membranen auf Extrahierbarkeit und Interaktion synaptischer Proteine

Ausgehend von der Eigenschaft Synaptophysins als spezifisch cholesterolbindendes Protein in der Membran synaptischer Vesikel wurde nun genauer untersucht, welche Auswirkungen die Verminderung des membranären Cholesterolgehaltes auf die Eigenschaften von Synaptophysin und die Ausbildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes sowie auf die anderen synaptischen Proteine hat.

3.3.1 Extraktion synaptischer Proteine aus Zelllinien nach Cholesterolverminderung

Der Cholesterolgehalt in den nicht neuronalen und neuroendokrinen Zellkulturen wurde durch Filipin und Methyl- β -cyclodextrin (β -MCD) vermindert, welche auf unterschiedliche Art den Cholesterolgehalt von Zellen senken. (i) Filipin, ein cholesterolbindendes Fluorochrom, komplexiert mit membranärem Cholesterol zu multimerischen globulären Depots innerhalb der Membran. Dabei wird der physikalische Zustand der Membran nur zu einem geringen Maße beeinflusst und die Membranfluidität weitgehend erhalten (Gimpl et al., 1997). (ii) Methyl- β -cyclodextrin (β -MCD) ist dagegen ein streng oberflächenwirksames Agens, welches weder an die Membran bindet noch in die Membran eintritt. Es vermindert sehr potent und selektiv membranäres Cholesterol, vor Proteinen und anderen Lipiden. Dabei wird Cholesterol in eine zentrale, nicht polare Höhle innerhalb der Membran eingeschlossen (Pang et al., 1999). Methyl- β -cyclodextrin bewirkt zusätzlich die selektive Freisetzung von membranassoziierten Proteinen in unterschiedlicher Weise zu dem nicht ionischen Detergens Triton X-100. Die Behandlung mit Methyl- β -cyclodextrin kann zu einer Veränderung der zellulären Morphologie führen ohne dabei die Zelle zu lysieren (Ilangumaran et al., 1998).

Die Auswirkungen der spezifischen cholesterolvermindernden Substanzen auf die synaptischen Proteine wurden in Neuronen und verschiedenen Zellreihen untersucht.

Die Zellreihe CHOp38 diente als Modellsystem der Analyse von Synaptophysin als integralem Membranprotein. Dabei kann das Verhalten von Synaptophysin unabhängig von den anderen in dieser Arbeit relevanten Vesikelproteinen untersucht werden, da diese Proteine nicht in der CHOp38-Zellreihe exprimiert werden. Die neuroendokrine Zellreihe PC12 ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung von neurosekretorischen Vesikeln und ermöglicht durch die gleichzeitige Expressierung verschiedener Membranproteine Untersuchungen weiterer Vesikelproteine innerhalb der subzellulären Membranfraktionen. An diesem Zellmodell konnte die Auswirkung der Filipin-vermittelten Cholesterolverminderung auf die Extrahierbarkeit der Proteine des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes und des SNARE-Komplexes untersucht werden.

3.3.1.1 Inkubation mit Filipin

Es sollte nun genauer analysiert werden, wie die Extrahierbarkeit von Synaptophysin durch die Behandlung mit Filipin beeinflusst werden kann.

CHOp38-Zellkulturen und PC12- Zellkulturen wurden zuerst bis zum LP2-Äquivalent aufbereitet und dann mit Filipinkonzentrationen von 4 µg/ml bis 100 µg/ml inkubiert. Dazu wurde das Pellet in 50 µl bzw. 100 µl der entsprechenden Konzentration an Filipin in PBS aufgenommen und fünfmal durch eine 23G-Nadel gezogen. Die Inkubation verlief im Wasserbad bei 37°C für 1 Stunde. Anschliessend wurde den Ansätzen direkt 500 µl bzw. 1000 µl Extraktionspuffer-Triton X-100 zugesetzt und für 1 Stunde unter Schütteln auf Eis extrahiert.

Die Behandlung von CHOp38-Zellen mit einer hohen Filipinkonzentration von 100 µg/ml führte zu deutlich erhöhten Mengen an nicht extrahierbarem Synaptophysin im Vergleich zur Kontrolle. Das gleiche Ergebnis war noch bei 80 µg/ml Filipin erkennbar (*Abb. nicht gezeigt*). Die Detergendlöslichkeit von Synaptophysin nahm mit abnehmender Filipinkonzentration wieder zu, so dass nach Inkubation mit 20 µg/ml und 4 µg/ml Filipin nur noch geringe Mengen an nicht extrahierbarem Synaptophysin im Non-Extrakt nachweisbar waren. Der extrahierbare Anteil von Synaptophysin stellte sich jeweils im Extrakt E dar (*Abb. 10*).

Nach Inkubation von PC12-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Filipin war eine ähnliche Veränderung der Detergendlöslichkeit von Synaptophysin wie bei den CHOp38-Zellen zu sehen. Durch Inkubation mit 100 µg/ml Filipin stieg der Anteil an nicht extrahierbarem Synaptophysin deutlich an. Nach Inkubation mit 20 µg/ml und 4 µg/ml Filipin waren im Vergleich zur Kontrolle im Non-Extrakt NE noch geringe Spuren an Synaptophysin nachweisbar (*Abb. 10*).

Beeinflussung der Extrahierbarkeit von Synaptophysin und den SNARE-Proteinen durch Filipin

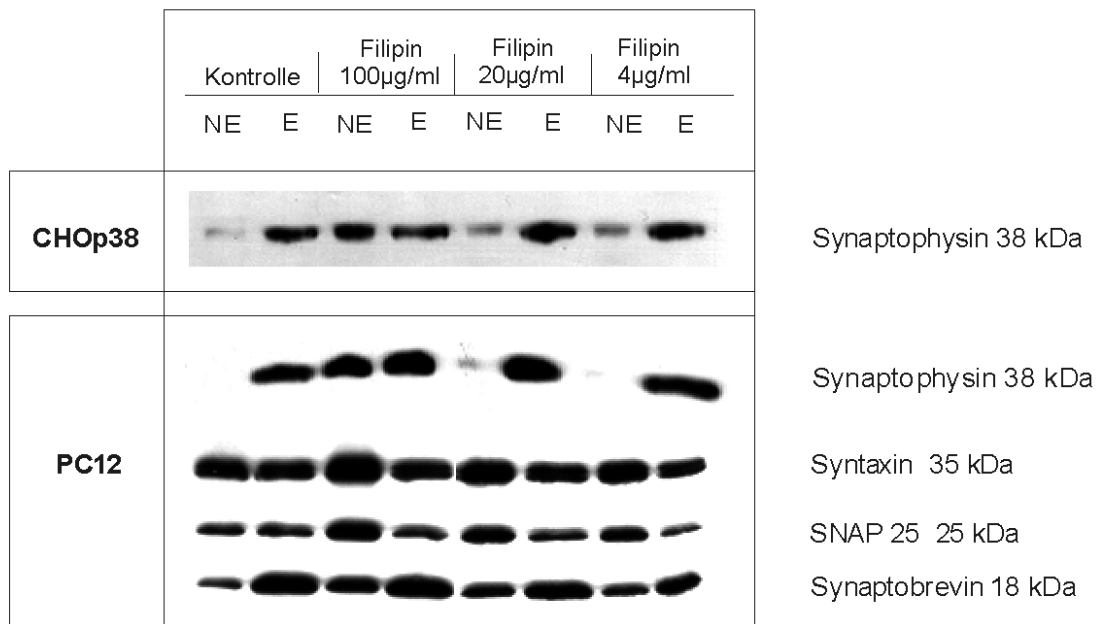


Abb. 10. Proteinproben des aufbereiteten LP2-Äquivalentes von CHOp38-Zellen und PC12-Zellen wurden mit Filipinkonzentrationen von 100 µg/ml, 20 µg/ml und 4 µg/ml für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit Triton X-100 extrahiert. Die Extrahierbarkeit von Synaptophysin war nach Inkubation mit 100 µg/ml Filipin deutlich vermindert, so dass große Mengenanteile von Synaptophysin im Non-Extrakt (NE) detektierbar waren. Mit abnehmender Filipinkonzentration nahm die Detergenslöslichkeit wieder zu. Zu beachten ist die fast vollständige Löslichkeit von Synaptophysin in Triton X-100 in der Kontrollprobe. Im Gegensatz dazu ist keine Veränderung des Löslichkeitsverhaltens der SNARE-Proteine durch Filipininkubation zu erkennen.

Für die synaptischen Proteine Syntaxin, SNAP 25 und Synaptobrevin ergab sich nach Filipininkubation und anschließender Extraktion mit Triton X-100 aus vesikulären Membranen der PC12-Zellen keine eindeutige Veränderung der Detergenslöslichkeit im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10).

Bei der höchsten Filipinkonzentration von 100 µg/ml Filipin scheint eine leichte Zunahme der SNARE-Proteine im Non-Extrakt erkennbar, wobei die überwiegend Plasmamembranständigen SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP 25 eine stärkere Veränderung ihrer Löslichkeit aufwiesen als das überwiegend Vesikel-ständige Synaptobrevin. Für die geringeren Konzentrationen an Filipin sind keine deutlichen Veränderungen in der Extrahierbarkeit der SNARE-Proteine mehr zu sehen.

Nach Filipininkubation der aufbereiteten vesikulären Membranen von CHOp38-Zelllinien und PC12-Zelllinien sank also der Anteil an in Triton X-100 extrahierbarem Synaptophysin deutlich. Synaptophysin wurde damit im Detergens unlöslicher.

3.3.1.2 Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin

Experimente mit Methyl- β -cyclodextrin zur Verminderung des Cholesterolgehaltes zellulärer Membranen wurden an dem LP2-Äquivalent von CHOp38-Zellkulturen und PC12-Zellkulturen durchgeführt und weiterführend auch an den Fraktionen ungereinigter synaptischer Vesikel LP2 embryonaler und adulter Wistar Ratten (*siehe Kapitel 3.3.2.*).

Aufbereitetes LP2 wurde in 300 μ l PBS resuspendiert und mit den entsprechenden Konzentration an Methyl- β -cyclodextrin für 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschliessend wurde den Inkubationsansätzen Extraktionspuffer mit Triton X-100 zugegeben und für 1 Stunde extrahiert. Die Proben wurden im weiteren Verlauf durch chemische Quervernetzung oder Immunpräzipitation aufgearbeitet.

Bei den CHOp38-Zellen war eine deutliche Abnahme der Extrahierbarkeit von Synaptophysin nach Inkubation mit 100 mM β -MCD erkennbar. Geringere Konzentrationen von 50 mM β -MCD und 25 mM β -MCD führten zu einem vermindert nachweisbaren Effekt, jedoch konnten auch hier Spuren von Synaptophysin im Non-Extrakt gefunden werden. Die Detergenslöslichkeit von Synaptophysin verhielt sich somit in CHOp38-Zellen nach β -MCD-Inkubation ähnlich wie nach Filipininkubation (*Abb. 11*).

Im folgenden Schritt wurde das Verhalten der Vesikelproteine nach Behandlung von PC12-Zellen mit Methyl- β -cyclodextrin untersucht. Die Ergebnisse der CHOp38-Zellreihe nach β -MCD-Inkubation bezüglich Synaptophysin konnten auch an der PC12-Zellreihe belegt werden. Die Extrahierbarkeit von Synaptophysin sank nach Inkubation mit 10 mM β -MCD bzw. 1 mM β -MCD, was an den detektierbaren Anteilen von Synaptophysin im Non-Extrakt zu erkennen ist. Ein Vergleich der Wirkungen von 20 μ g/ml Filipin mit der Wirkung von Methyl- β -cyclodextrin zeigt die ähnliche Beeinflussung der synaptischen Proteine durch die membranäre Cholesterolverminderung (*Abb. 11*).

Die Untersuchung der SNARE-Proteine Syntaxin (*Abb. nicht gezeigt*), SNAP 25 und Synaptobrevin ergaben bei den eingesetzten Konzentrationen an Filipin und Methyl- β -cyclodextrin keine auffälligen Veränderungen.

Durch Inkubation der vesikulären Membranen der CHOp38-Zelllinie und der PC12-Zelllinie mit Methyl- β -cyclodextrin nahm der Anteil an in Triton X-100 extrahierbarem Synaptophysin stark ab. Die Detergenslöslichkeit von Synaptophysin wurde durch β -MCD wie auch durch Filipin stark vermindert.

Die Auswirkung der Verminderung des Cholesterolgehaltes durch Methyl- β -cyclodextrin und Filipin auf die synaptischen Proteine

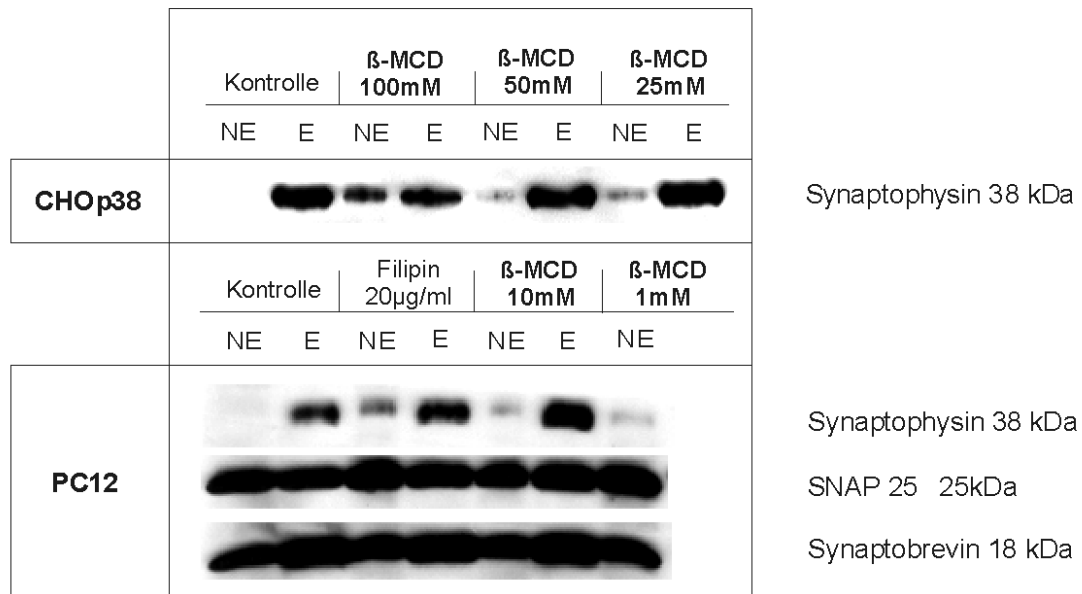


Abb. 11. Proteinproben des aufbereiteten LP2-Äquivalent von CHOp38-Zellen und PC12-Zellen wurden mit Konzentrationen an β -MCD von 100 mM bis 1 mM bzw. mit 20 μ g/ml Filipin für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Triton X-100 extrahiert. Die Detergenslöslichkeit von Synaptophysin sank deutlich nach Inkubation mit β -MCD im Vergleich zur Kontrolle, wodurch ein großer Anteil der Proteinprobe im Non-Extrakt nachweisbar war. Dies wird bei hoher β -MCD-Konzentration von 100 mM noch deutlicher. Die Ergebnisse ähneln dem Verhalten von Synaptophysin nach Filipininkubation (siehe auch Abb. 10).

3.3.2 Beeinflussung synaptischer Vesikelproteine nach Veränderung des Cholesterolgehaltes

In den folgenden Experimenten wurde der Cholesterolgehalt von adulten und embryonalen Neuronen durch Methyl- β -cyclodextrin und zusätzlich durch Cholesteroxidase verändert. Cholesteroxidase oxidiert dabei den zugänglichen Anteil an Cholesterol zu 4-Cholesten-3-on, wodurch Cholesterol in ein funktionell inaktives Steroid umgewandelt wird. Das modifizierte Cholesterol wird dabei nicht aus der Membran entfernt. Da 4-Cholesten-3-on dem Cholesterolmolekül sehr ähnlich ist, werden durch die Wirkung der Cholesteroxidase kaum Veränderungen des physikalischen Zustandes der Plasmamembran bewirkt und die Fluidität der Membran bleibt relativ konstant (Gimpl et al., 1997). Cholesteroxidase penetriert nicht die Membrandoppelschicht (Lange et al., 1989).

Da Methyl- β -cyclodextrin die Extrahierbarkeit von Synaptophysin vermindert, wurden die folgenden Experimente weitgehend mit dem Verfahren der chemischen Quervernetzung durchgeführt.

3.3.2.1 Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin

Die synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin sind in großer Menge in den Proteinfractionen aus adultem Rattengehirngewebe nachweisbar und zu einem entsprechend kleineren Anteil in den Fractionen aus embryonalem Rattengehirngewebe (*siehe Abb. 2, 3, 4*). Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex formiert sich zum Abschluss der Embryonalphase im Rattengehirn und ist nur in sehr geringen Spuren bereits am 20. Embryonaltag (E20) nachweisbar. Im folgenden Experiment wurde an adulten und embryonalen Rattengehirnproben durch chemische Quervernetzung untersucht, wie die Vesikelproteine durch Methyl- β -cyclodextrin vermittelte Cholesterolverminderung der synaptischen Vesikelmembranen beeinflusst werden.

Im Vergleich zum adulten Gehirn ist in den Proben nach chemischer Quervernetzung von embryonalen Rattengehirnen nur eine Synaptobrevinbande bei 18 kDa und eine Synaptophysinbande bei 38 kDa durch Immundetektion mit Antikörpern gegen Synaptobrevin und Synaptophysin erkennbar.

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex kann nach chemischer Quervernetzung embryonaler Proben nicht immundetektiert werden, was darauf zurückzuführen ist, dass noch keine Komplexbildung in embryonalen Neuronen stattfindet (Becher et al., 1999). Teilweise tauchen jedoch bereits Spuren des Komplexes in den letzten Embryonaltagen auf, was auf die Ansätze der differenzierten post partum Ausreifung hindeutet. Auch die Bildung des Synaptobrevindimers nimmt während der neuronalen Reifung zu, da am Tag E20 bereits geringe Spuren des Dimers zu sehen sind (Becher et al., 1999).

Nach Behandlung mit 37.5 mM β -MCD war deutlich weniger Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in den adulten Proteinfractionen detektierbar und in den embryonalen Proteinfractionen verschwindet der Komplex vollständig, nachdem er in geringer Menge in der Kontrolle durch Immundetektion mit dem sensitiveren Synaptobrevinantikörper nachgewiesen werden konnte (*Abb. 12*).

Weiterhin war nach β -MCD-Inkubation eine geringe Abnahme der Menge an Synaptobrevin in der Probe erkennbar. Das Synaptobrevindimer verhält sich in ähnlicher Weise wie das Monomer. Auch hier sinkt durch die Wirkung von 37.5 mM β -MCD der Gehalt an Synaptobrevindimer in der Probe leicht ab. Für das Synaptophysinmonomer und das Synaptophysindimer ergeben sich durch die β -MCD-vermittelte Cholesterolverminderung keine erkennbaren Veränderungen in diesem Ansatz.

Die Veränderung der Synaptophysin-Synaptobrevin-Interaktion in synaptischen Vesikeln nach Behandlung mit Methyl- β -cyclodextrin

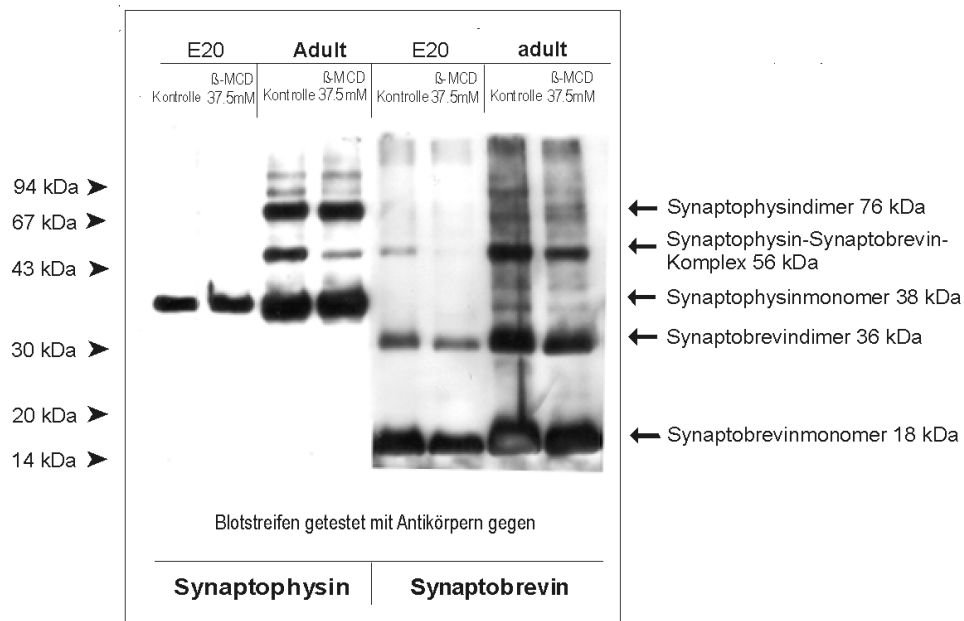


Abb. 12. Proteine embryonaler (E20) und adulter synaptischer Vesikelfractionen wurden mit 37.5 mM β -MCD für 20 min bei 37°C inkubiert und nach Triton X-100-Extraktion mit DSS chemisch quervernetzt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion mit Antikörpern gegen Synaptophysin und Synaptobrevin analysiert. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex ist in adulten Gewebeproben gut nachweisbar und gar nicht oder nur in sehr geringen Spuren in den entsprechenden embryonalen Proben. Die Komplexbildung wurde durch die Wirkung von β -MCD im adulten Gewebe deutlich reduziert. In geringerem Maße sank auch die Menge an detektierbarem Synaptobrevin (Monomer und Dimer) nach β -MCD-Inkubation in adultem und in embryonalem Gewebe.

Es wurde nun weiterführend die Dosisabhängigkeit der Wirkung von Methyl- β -cyclodextrin auf die Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes untersucht. Die Abb. 13 zeigt die Verminderung der Komplexbildung zwischen Synaptophysin und Synaptobrevin in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Methyl- β -cyclodextrin. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex war nach Inkubation mit 40 mM β -MCD und 10 mM β -MCD mit deutlich geringerem Anteil in der Membran vorhanden im Vergleich zur Kontrolle. Dies wurde nach Detektion mit Synaptophysinantikörpern noch deutlicher sichtbar. Erst bei sehr geringer β -MCD-Konzentration von 2.5 mM waren Spuren des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes durch Detektion mit Synaptophysinantikörpern wieder gut nachweisbar.

In den Untersuchungen war außerdem eine sehr geringe Abnahme der Monomere und Dimere von Synaptophysin und Synaptobrevin nach Inkubation mit hohen β -MCD-Konzentrationen von 40 mM und 37.5 mM zu beobachten.

Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von Methyl- β -cyclodextrin auf die Vesikelproteine

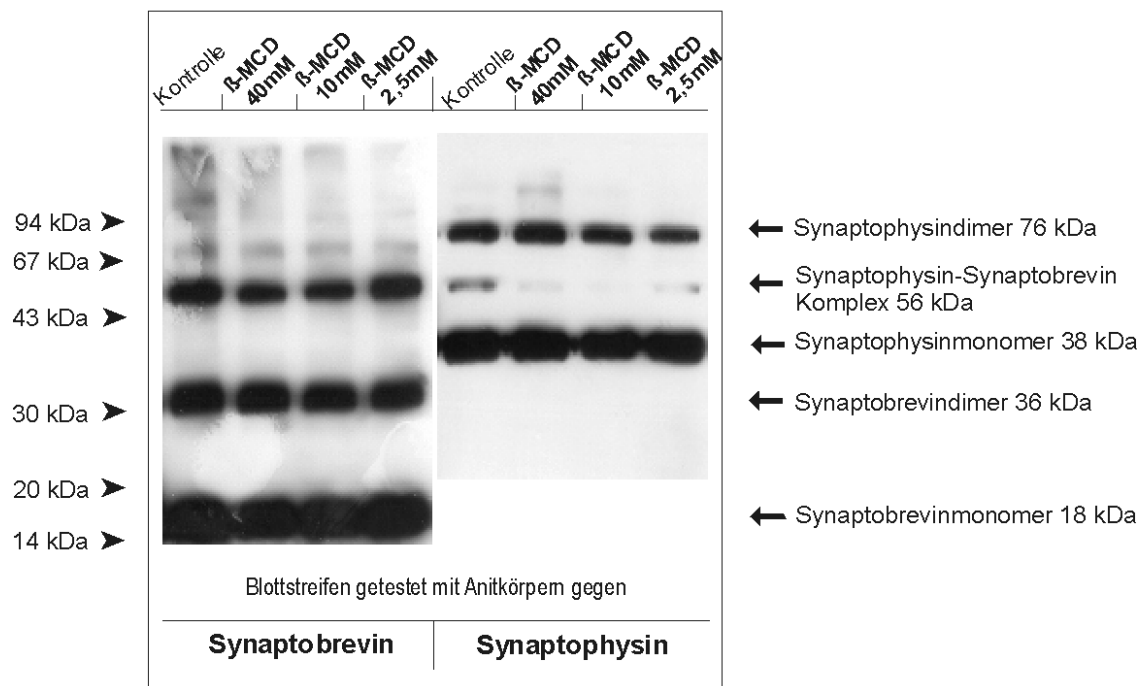


Abb. 13. Proteine von adulten synaptischen Vesikelfractionen wurden nach Inkubation mit β -MCD für 20 min bei 37°C mit DSS chemisch quervernetzt. Die Membranen wurden anschliessend sedimentiert und mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion analysiert. Die Dosisabhängigkeit der Komplexbildung ist für β -MCD-Konzentrationen von 40 mM, 10 mM und 2.5 mM dargestellt. Zu beachten ist die deutliche Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes bei hohen Konzentrationen an β -MCD und die gleichzeitige leichte Abnahme der Monomere und Dimere von Synaptophysin und Synaptobrevin.

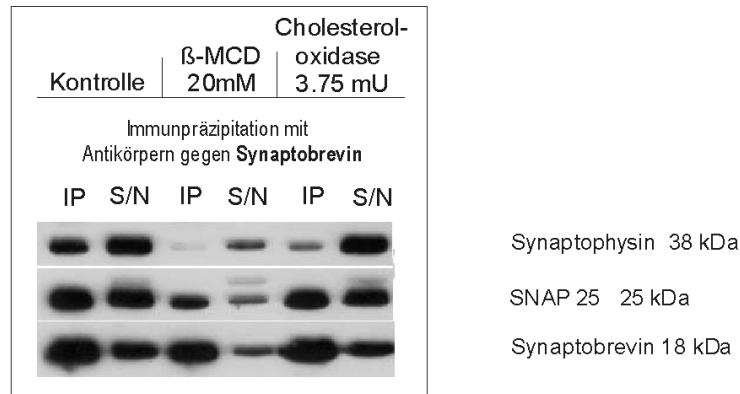
3.3.2.2 Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin und Cholesteroloxidase im Vergleich

Im Folgenden soll nun die Beeinflussung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes durch Inkubation mit Methyl- β -cyclodextrin zusätzlich auch im Immunpräzipitationsansatz und vergleichend zur Wirkung der Cholesteroloxidase an synaptischen Vesikeln adulter Ratten analysiert werden.

Nach Behandlung mit 20 mM β -MCD war die Menge an Synaptophysin im Immunpräzipitat stark vermindert im Vergleich zur Kontrolle, obwohl ausreichend Synaptophysinmoleküle in der Probe vorhanden waren (Abb. 14). Dabei änderte sich die Menge an detektierbarem Synaptobrevin in der Proteinprobe nicht auffällig. Da bereits gezeigt wurde, dass die Löslichkeit von Synaptophysin in Triton X-100 nach β -MCD-Inkubation deutlich abnimmt, kann die verminderte Immunpräzipitation des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes auch durch die geringe Extrahierbarkeit von Synaptophysin verursacht sein. Es sollen daher die synaptischen Proteine zusätzlich nun durch chemische Quervernetzung analysiert werden.

Die Darstellung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes nach Behandlung mit Methyl- β -cyclodextrin durch Immunpräzipitation und Chemische Quervernetzung

14.1 Immunpräzipitation



14.2 Chemische Quervernetzung

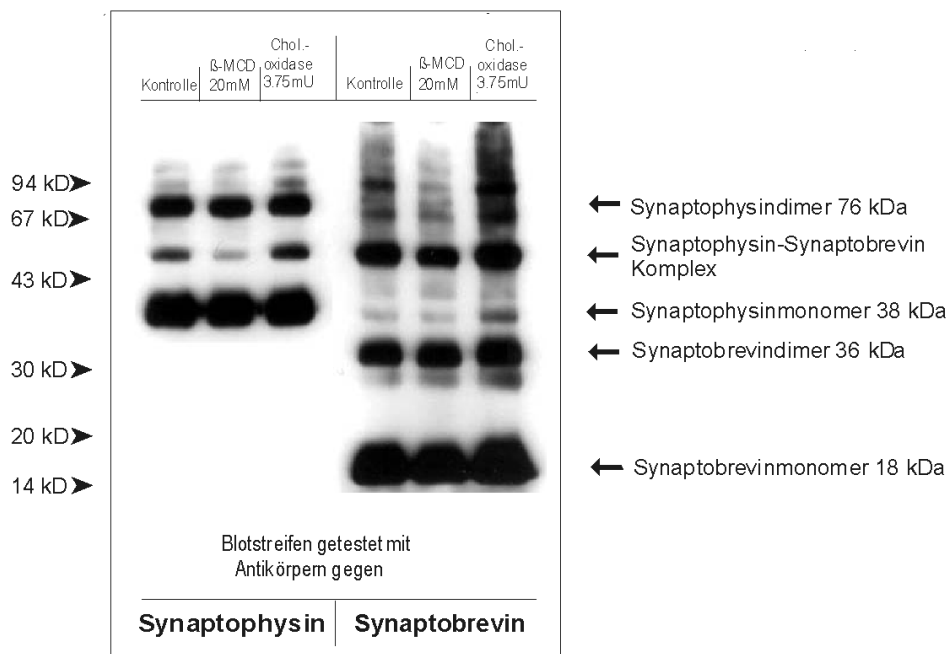


Abb. 14. Die Proteinproben der ungereinigten Fraktion der synaptischen Vesikel wurden mit 20 mM β -MCD oder 3.75 mU Cholesteroloxidase/Sphingomyelinase inkubiert und im Vergleich mit Antikörpern gegen Synaptobrevin immunpräzipitiert oder chemisch quervernetzt. Dabei wurden in den jeweiligen Ansätzen gleiche Mengen an Protein eingesetzt. Die Immunpräzipitation zeigte eine deutliche Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes nach β -MCD-Inkubation (Abb. 14.1) Auch nach Inkubation mit Cholesteroloxidase wurde der Komplex deutlich vermindert detektiert. Im Ansatz der chemischen Quervernetzung ergab sich nach β -MCD-Inkubation eine Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes durch β -MCD-Inkubation. Nach Inkubation mit Cholesteroloxidase war jedoch eine Zunahme des Komplexes zu beobachten. Synaptophysin und Synaptobrevin waren zusätzlich als Monomere und Dimere leicht erhöht im Cholesteroloxidase-Ansatz (Abb. 14.2). Die starke Abnahme der Komplexbildung von Synaptophysin mit Synaptobrevin entspricht den Ergebnissen in Abb. 13. Die Ergebnisse nach Inkubation mit Cholesteroloxidase zeigen gegensätzliche Bilder zwischen dem Ansatz nach chemischer Quervernetzung und dem entsprechenden Immunpräzipitat.

Auch nach chemischer Quervernetzung des gleichen Inkubationsansatzes ergab sich eine deutliche Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes, welche bei Immundetektion mit Synaptophysinantikörpern deutlicher erkennbar war. Die Mengen der Monomere und der Dimere von Synaptophysin und Synaptobrevin schienen bei dieser β -MCD-Konzentration unverändert zu bleiben (*Abb. 14.2*).

Durch Inkubation der Proben mit 3.75 mU Cholesteroloxidase im gleichen Ansatz war nach der Immunpräzipitation eine Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes durch deutlich verminderte Präzipitation von Synaptophysin erkennbar (*Abb. 14.1*). Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch nach chemischer Quervernetzung der Proben eine deutliche Zunahme des Komplexes sowie der einzelnen Dimere und Monomere (*Abb. 14.2*), welche bei Synaptobrevin deutlicher war als bei Synaptophysin.

Nach Cholesterolverminderung der Membranen mittels Methyl- β -cyclodextrin ist also durch Immunpräzipitation wie auch durch chemische Quervernetzung eine deutlich Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes erkennbar. Dabei sinkt die Menge an gebildetem Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex mit zunehmender Konzentration an Methyl- β -cyclodextrin. Die Menge der Monomere und Dimere von Synaptophysin und Synaptobrevin in den Proben änderte sich durch die Senkung des Cholesterolgehaltes der Membranen nur bei sehr hoher β -MCD-Konzentration.

3.3.2.3 Inkubation von hippokampalen Zellkulturen mit Lovastatin

Lovastatin führt zu einer Abnahme des gesamten Cholesterolgehaltes der Zelle durch Blockade eines frühen Schrittes der Cholesterolsynthese. Lovastatin hemmt dabei die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, wodurch der Gesamtgehalt der Zellen an Cholesterol während der Dauer der Inkubation abnimmt.

Für die Untersuchung der Wirkung von Lovastatin wurden reife hippokampale Zellkulturen verwendet. Diese können nach vollständiger Ausreifung als ein Modell für die Proteinverhältnisse und Proteininteraktionen in adulten Neuronen dienen. Für die Langzeitinkubation von bis zu 25 Stunden im Brutschrank konnten nur ausgereifte Zellkulturen verwendet werden, die sich bereits in einem lebenserhaltenden Nährmedium befanden. Frisch zubereitete Synaptosomenfraktionen (P2) oder ungereinigte Vesikelfraktionen (LP2) wären für die Langzeitinkubation ungeeignet. Das serumfreie Nährmedium der Zellkulturen enthält keine Lipidanteile, so dass die Versorgung der Zellen mit Lipiden ausschliesslich durch intrazelluläre Speicher und die zelleigene Synthese geregelt werden kann.

Der Einfluss von Lovastatin auf den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex

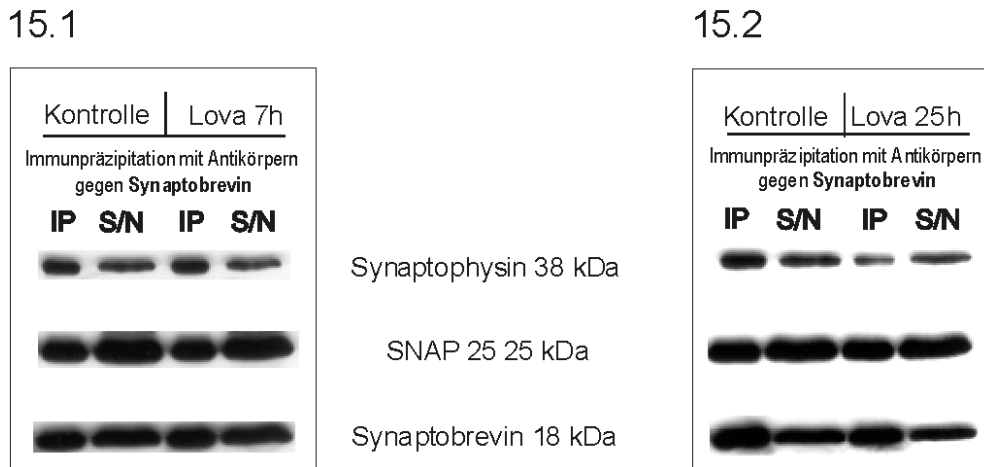


Abb. 15. Hippokampale Zellkulturen wurden mit 5 μ M Lovastatin für 7 (Abb. 15.1) bzw. 25 Stunden (Abb. 15.2) im Brutschrank inkubiert und als LP2-Äquivalent aufbereitet. Nach Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Synaptobrevin wurden die Proben sedimentiert und mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion analysiert. Zu beachten ist die deutliche Verminderung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes nach 25 Stunden Lovastatininkubation. Eine Beeinflussung der SNARE-Proteine SNAP 25 und Synaptobrevin war nicht zu erkennen.

Zur Lovastatininkubationen wurden die Zellkulturen mit 5 μ M Lovastatin, in 1 ml Medium pro Schale gelöst, versetzt und für 7 bzw. 25 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschliessend gemäß der Anleitung zur Aufbereitung von Zellkulturen (siehe Kapitel 2.2.2) behandelt. Das resultierende Sediment, bestehend aus Zellen und Membranbestandteilen, wurde in 500 μ l Extraktionspuffer mit Triton X-100 aufgenommen und extrahiert.

Die Blockade der Cholesterolsynthese in hippocampalen Zellkulturen führte nach 25 Stunden Inkubation zu einer deutlichen Abnahme der Komplexbildung zwischen Synaptophysin und Synaptobrevin (Abb. 15.2). Dieser Effekt war daran zu erkennen, dass die Menge an detektierbarem Synaptophysin im Immunpräzipitat deutlich gegenüber der Kontrolle nach Präzipitation mit Antikörpern gegen Synaptobrevin verringert war. Dabei war jedoch Synaptophysin in großer Menge im Überstand S/N vorhanden war. Nach 7 Stunden Inkubationsdauer konnten noch keine Auswirkungen auf den Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex gefunden werden (Abb. 15.1).

Eine Inkubationszeit von 7 Stunden schien dabei noch nicht auszureichen, den Cholesterolgehalt der zellulären Membranen durch Blockade der Cholesterolsynthese zu beeinflussen. Nach 25 Stunden Lovastatininkubation war jedoch die Verminderung des Cholesterolanteils der synaptischen Vesikelmembran ausreichend groß, um zu einer Abnahme der Komplexbildung der Membranproteine Synaptophysin und Synaptobrevin zu führen.

3.3.2.4 Synaptischen Vesikelproteine in Niemann-Pick C1 Mäusen

In den folgenden Experimenten wurde die Beeinflussung der Eigenschaften und der Komplexbildung der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin in homozygoten und heterozygoten Mausmutanten für NPC1 im Vergleich zum Wildtyp durch chemische Quervernetzung untersucht.

Zuerst wurde der Wildtyp, eine Maus ohne nachweisbare Mutation im NPC1-Gen, mit einem Heterozygoten Maus-Typ für die Niemann-Pick Krankheit verglichen (*Abb. 16.1*). Zwischen dem Wildtyp und den Heterozygoten konnte jedoch kein quantitativer Unterschied für das Vorhandensein sowohl der Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin, als auch für die Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen gefunden werden.

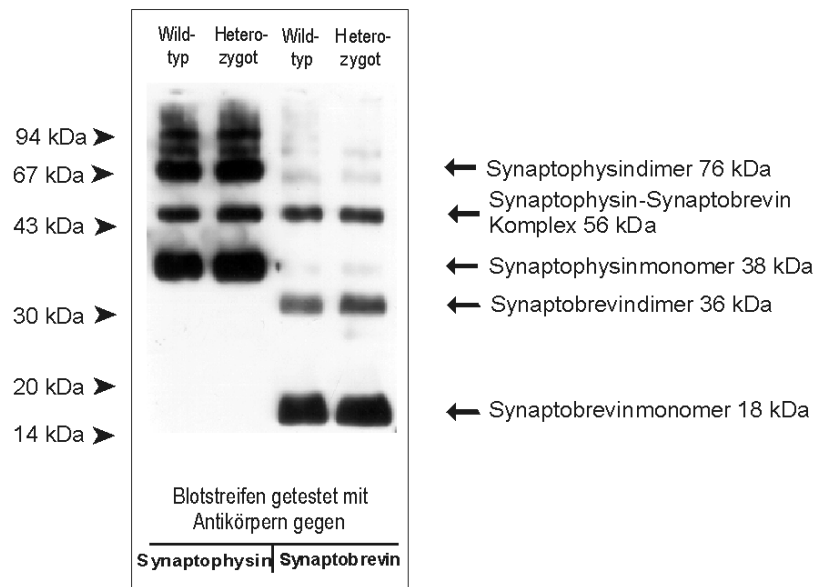
Im nächsten Schritt wurden der heterozygote und der homozygote Typ für die NPC1 Mutation vergleichend analysiert (*Abb. 16.2*). Nach der chemischen Quervernetzung war eine starke Verminderung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes bei den homozygoten Mäusen sichtbar.

Durch densitometrische Messung der Proteinbanden, bezogen auf das jeweilige Proteinmonomer, konnte die Abnahme des Komplexes bei Homozygoten eindeutig bestätigt werden (*Abb. 17*). Weiterhin konnte so auch eine Abnahme des Synaptobrevindimers und des Synaptophysindimers bei den Homozygoten festgestellt werden. Bei genauer Betrachtung der Blotstreifen fällt zusätzlich eine geringe Abnahme der Monomere von Synaptobrevin und Synaptophysin bei den homozygoten Mutanten auf.

In diesen Untersuchungen war also festzustellen, dass die homozygoten Mutanten für das NPC1-Gen eine auffällige Verminderung von Synaptophysin innerhalb der cholesteroldefizienten synaptischen Vesikelmembran aufwiesen. Dies zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp bzw. den heterozygoten Mutanten. Dabei fiel eine sehr deutliche Verminderung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes auf. Für heterozygote Mutanten wie auch für den Mauswildtyp ergaben sich keine erkennbaren Veränderungen der synaptischen Vesikelproteine.

Untersuchung der Proteine des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in Niemann-Pick C1 Mäusen

16.1



16.2

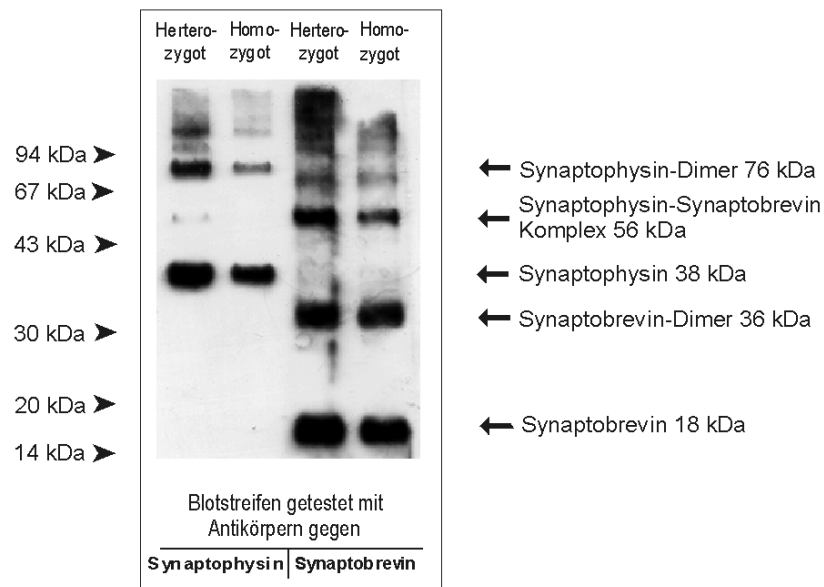


Abb. 16. Proteine adulter synaptischer Vesikelfraktionen von homozygoten und heterozygoten Niemann-Pick C1 Mausmutanten wurden chemisch quervernetzt und im Vergleich dargestellt. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Heterozygoten und dem Wildtyp in Bezug auf das Verhalten der untersuchten Vesikelproteine gefunden werden. Auffällig ist jedoch die starke Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes bei den Homozygoten im Vergleich zu den Heterozygoten. Zu beachten ist hier weiterhin die gleichzeitige leichte Abnahme an Synaptophysin und Synaptobrevin im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten.

Synaptophysin, Synaptobrevin und der gemeinsame Komplex in Niemann-Pick C1 Mäusen

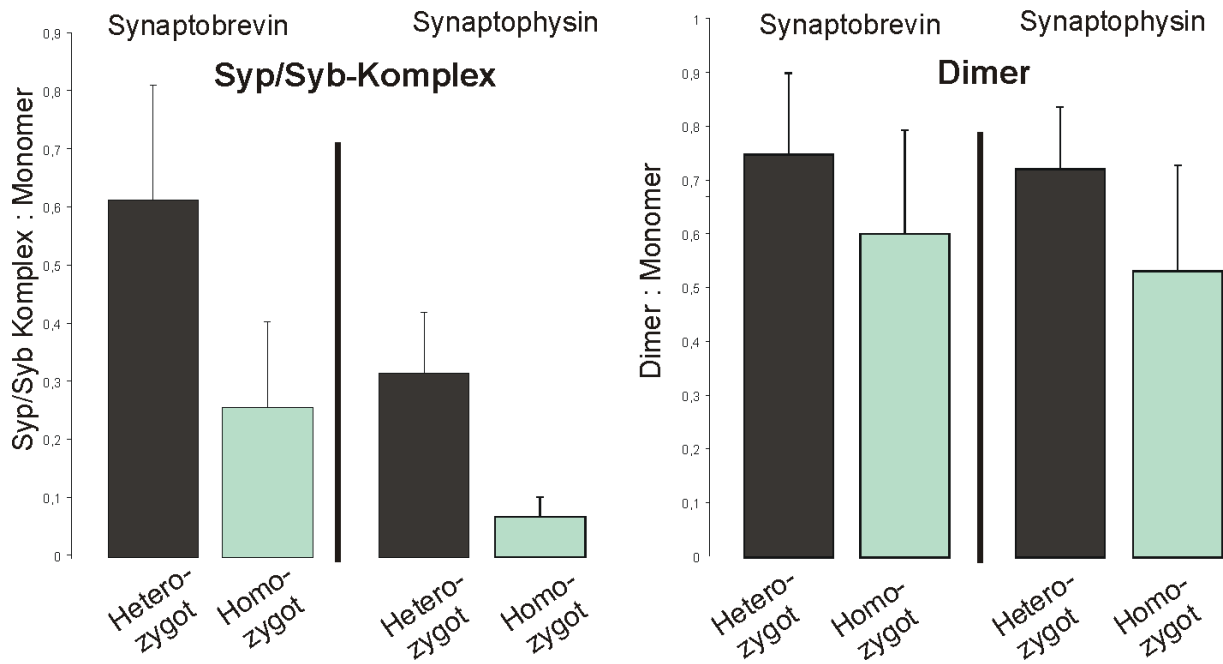


Abb. 17. Die Gelbanden aus Abb. 16.2 wurden durch densitometrischer Messung halbquantitativ analysiert bei $n=4$. Dabei wurde der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex bzw. das jeweilige Proteindimer im Verhältnis zu dem entsprechenden Proteinmonomer der zu untersuchenden Bande gesetzt und für heterozygote und homozygote Mausmutanten verglichen. Hiermit wird die deutliche Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes und des Synaptobrevindimers bzw. des Synaptophysindimers belegt.

4 Diskussion

4.1 Schlüsselproteine synaptischer Transmission

Synapsen bilden spezialisierte Kontaktpunkte zwischen Neuronen zur Übertragung und Weiterleitung von Informationen. Die Exozytose ist hierfür ein fundamentaler Vorgang, wobei Neurotransmitter aus den synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt werden und gleichzeitig im Zuge der Membranfusion Membrandomänen neu geordnet und mit spezifischen Proteinmolekülen ausgestattet werden. Die Freisetzung der Transmitter ist dabei ein hochregulierter Prozess, bei dem die übertragenen Signale ständig auf die Anforderungen des Organismus abgestimmt werden und falsche Signale unterdrückt werden müssen. Eine entscheidende feinregulierende Aufgabe bei der Interaktion zwischen den extrem reaktiven SNARE-Proteinen übernimmt der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in der synaptischen Vesikelmembran. Synaptophysin reagiert dabei spezifisch mit Synaptobrevin und reguliert wahrscheinlich dessen Verfügbarkeit für die Bildung des Fusionskomplexes mit der Plasmamembran. Erst vor kurzem wurde Synaptophysin zusätzlich als cholesterolbindendes Protein in der synaptische Vesikelmembran identifiziert (Thiele et al., 2000). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, zu untersuchen, inwieweit auch die Interaktion von Synaptophysin mit Synaptobrevin vom Cholesterolgehalt der synaptischen Vesikelmembran abhängig ist und durch Cholesterolverminderung der Membran beeinflusst werden kann.

4.2 Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex – ein Charakteristikum synaptischer Vesikel in reifen Neuronen

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex wurde als Regulationselement der Exozytose synaptischer Vesikel beschrieben. Es soll daher zunächst auf seine Rolle während plastischer Prozesse in Neuronen, wie der Zellentwicklung und der Adaptation synaptischer Transmission, näher eingegangen werden.

Die Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes ist vom Reifungsgrad der neuronalen Zellen abhängig. Er kommt ausschliesslich auf der synaptischen Vesikelmembran von adulten Neuronen vor.

Obwohl die beiden Proteine Synaptophysin und Synaptobrevin in den embryonalen synaptischen Vesikelmembranen vorhanden sind, fusionieren sie noch nicht zu einem Komplex. Die Fusion konnte jedoch durch Zugabe von adultem synaptischen Zytosol induziert werden, was für eine zusätzliche posttranslationale Modifikation von Synaptophysin

durch einen induzierenden zytosolischen Faktor in adultem Rattengehirn spricht (Becher et al., 1999). Im Gegensatz zum Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex wird der exozytotischen SNARE-Komplex sowohl in adulten Neuronen mit einem Hauptteil in der Plasmamembran und zusätzlich einem geringeren Anteil in der Vesikelmembran als auch in unreifen Neuronen und neuroendokrinen Zellen gebildet.

Die beiden synaptischen Proteinkomplexe existieren nebeneinander in der Präsynapse und schließen sich gegenseitig aus. Das Synaptobrevin des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes kann zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran schnell in den SNARE-Komplex eingehen. Jedoch kann Synaptobrevin, welches in dem besonders stabilen SNARE-Komplex gebunden vorliegt, erst nach regulierter Dissoziation des Komplexes durch ATP-Hydrolyse mittels NSF eine Interaktion mit Synaptophysin eingehen.

Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex trägt entscheidend zu kurzfristigen plastischen Veränderungen in Neuronen bei, welche durch Inkubation mit verschiedenen Toxinen induziert werden können, wobei entweder eine verminderte oder eine gesteigerte synaptische Aktivität ausgelöst wird. (i) Durch die Wirkung von Tetanusneurotoxin auf die Präsynapse wird sowohl die Formierung des SNARE-Komplexes auf der Plasmamembran als auch die Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes auf der Membran der synaptischen Vesikel blockiert. Tetanusneurotoxin spaltet dabei bevorzugt Synaptobrevin im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex, hat aber keine Wirkung auf Synaptobrevin innerhalb des SNARE-Komplexes. Somit führt die Inkubation mit Tetanusneurotoxin zu einer schnellen Abnahme des vesikulären Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes, jedoch nur zu einer langsamen Verminderung des SNARE-Komplexes in den Zellen. Das im SNARE-Komplex gebundene Synaptobrevin muss also im Verlauf membranärer Umbauvorgänge und Transportprozesse zuerst aus der Interaktion im Proteinkomplex freigesetzt werden, um durch das Toxin angreifbar zu sein. (ii) Tetrodotoxin blockiert selektiv spannungsabhängige Natriumkanäle in der neuronalen Plasmamembran und damit die Depolarisation der Synapse. Die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran läuft bei verminderter synaptischer Erregungsübertragung auf Ruhenniveau ab, wofür keine verstärkte Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes stattfindet. Dagegen scheint der Komplex aber besonders in Zeiten verstärkter synaptischer Transmission notwendig zu sein, die Zelle an die erhöhten Ansprüche synaptischer Effizienz anzupassen. Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex ermöglicht wahrscheinlich eine beschleunigte Verfügbarkeit von „aktivem“ Synaptobrevin zur Fusion in den SNARE-Komplex. Im folgenden soll daher näher auf die Auswirkungen erhöhter synaptischer Aktivität auf die synaptischen Proteinkomplexe

eingegangen werden. (iii) Die kurzzeitige Stimulation der synaptischen Transmission durch alpha-Latrotoxin führte zu einer stark erhöhten Fusionsrate der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran. Zur Aufrechterhaltung der deutlich erhöhten Exozytoseanforderungen an die Synapse bindet das verfügbare vesikuläre Synaptobrevin mit seinen SNARE-Partnern in der Plasmamembran und ermöglicht damit das Andocken der Vesikel als Voraussetzung zur Membranverschmelzung und nachfolgender Transmitterfreisetzung. Dabei wird der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex auf der Vesikelmembran aufgebraucht, während sich gleichzeitig vermehrt SNARE-Komplexe in der Plasmamembran formieren. Es scheint also, dass Synaptobrevin des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes nicht jedoch freies Synaptobrevin bevorzugt in den SNARE-Komplex bindet, da besonders der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex bei synaptischer Stimulation abnimmt.

Synaptophysin ist nicht absolut notwendig für die Exozytose, könnte jedoch durch Rekrutierung von Synaptobrevin in Zeiten schneller exozytotisch-endozytotischer Zyklen zur Beschleunigung der synaptischen Exozytose dienen. Dies wird hauptsächlich erreicht, indem Synaptophysin durch Bindung von freiem, sehr aktivem Synaptobrevin dessen mögliche Interaktion mit den vesikelständigen SNARE-Proteinen beeinflusst (Sugita et al., 1999) und damit die Bildung nicht funktioneller cis-SNARE-Komplexe auf der synaptischen Vesikelmembran verhindert. Diese cis-SNARE-Komplexe würden besonders im Zustand hochfrequenter synaptischer Aktivität eine Sackgasse der Membranfusion darstellen und somit die synaptische Effizienz wieder vermindern.

4.3 Synaptophysin und der Cholesterolgehalt von Membranen

Bei der Untersuchung des funktionellen Zusammenspiels von integralen Membranproteinen müssen ihre Wechselwirkungen mit dem Lipidverband der Membran berücksichtigt werden. Proteine können in verschiedenen Membrandomänen angeordnet sein, die sich durch ihren unterschiedlichen Gehalt an Phospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterol voneinander abgrenzen. Innerhalb einer Membran zeigen diese Domänen unterschiedliche Sensitivität gegenüber Detergenzien und können dadurch differenziert werden. Durch die Extraktion lassen sich nur die Rafts aus der Membran heraus lösen, die in dem jeweiligen Detergens löslich sind, aber nicht dissoziieren.

Hier wurde gezeigt, dass sowohl Synaptophysin und Synaptobrevin, als auch SNAP 25 in ähnlicher Weise durch Triton X-100, Octylglucopyranosid und Chaps aus der Membran gelöst werden können und der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nach Extraktion mit den verschiedenen Detergenzien unverändert immunpräzipitiert wird. Die Wechselwirkungen der Proteine im Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex innerhalb der Vesikelmembran

wurden also durch die Extraktion nicht unterschiedlich beeinflusst. Diese synaptischen Proteine scheinen daher in Membrandomänen angeordnet zu sein, die einen ähnlichen Lipidaufbau besitzen. Es ist dabei jedoch möglich, dass in der Membran der synaptischen Vesikel spezielle Membrannanodomänen existieren, die besonders die Ausbildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes ermöglichen, und neben anderen Membrandomänen vorliegen, in denen keine Komplexbildung stattfindet. Durch Triton X-100, Octylglucopyranosid und Chaps kann keine Unterscheidung solcher Nanodomänen erreicht werden. Jedoch wäre es interessant zu untersuchen, ob andere Detergenzien wie z.B. Lubrol WX diese Nanodomänen extrahieren können. Durch die Verwendung von Lubrol konnten bereits spezielle cholesterolhaltige Lipidmikrodomänen innerhalb der Plasmamembran isoliert werden, in denen Prominin angereichert ist. Prominin, ein mit Mikrovilli assoziiertes Membranprotein, interagiert wie Synaptophysin spezifisch mit Cholesterol. Beide Proteine sind komplett löslich in Triton X-100, aber nicht in Lubrol WX (Röper et al., 2000).

Bei der Untersuchung von Interaktionen der SNARE-Proteine wurde beobachtet, dass sich der größte Anteil stabiler SNARE-Komplexe erst nach Behandlung mit nicht ionischen Detergenzien bildet und dass in lebenden Neuronen die meisten der Komplexe durch die kontinuierliche Aktivität von NSF gespalten vorliegen (Otto et al., 1997). So kann nach Extraktion der zellulären Membranen kein genaues Abbild der membranären Proteinverhältnisse *in vivo* gegeben werden.

Zur besseren Beurteilung der Proteininteraktionen des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes, ohne dabei Veränderungen des Membranzustandes durch die denaturierende Wirkung von Detergenzien zu verursachen, wurden daher in dieser Arbeit zusätzlich zu den Immunpräzipitationsversuchen Untersuchungen mit dem Verfahren der chemischen Quervernetzung durchgeführt.

Die Interaktion von Synaptophysin und Synaptobrevin wird durch den Cholesterolgehalt der synaptischen Vesikelmembran reguliert. Cholesterol ist das wichtigste Membranlipid zur Aufrechterhaltung der Fluidität natürlicher Membranen (Bretscher und Munro et al., 1993). Durch den Entzug von Cholesterol kann die Organisation der Membranen in Domänen und Subdomänen stark beeinflusst werden, was zusätzlich Auswirkungen auf die Proteininteraktionen innerhalb der Membranen haben kann. Die Bindung von Cholesterol, als Teil der physiologischen Aufgabe von Synaptophysin, vermittelt wahrscheinlich bei den Funktionen von Synaptophysin innerhalb der Vesikelmembran. Dies wirft die Frage auf, wie der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex durch den zellulären Cholesterolgehalt

beeinflusst wird. Das Verhalten der integralen Membranproteine soll dabei zusätzlich in Bezug auf ihre Verankerung in cholesterolreichen Membransubdomänen betrachtet werden.

4.3.1 Cholesterol und seine Funktionen

Cholesterol wurde als ein in den Gliazellen produzierter Faktor identifiziert, der für die Ausreifung von Synapsen in Neuronen verantwortlich ist (Barres et al., 2001). Der Cholesterolgehalt in der Zellmembran spiegelt damit einen funktionellen Reifegrad der untersuchten Neuronen wider.

Der Cholesterol- und Phospholipidgehalt der in dieser Arbeit verwendeten Membranfraktionen variierte bei ersten Messungen in Abhängigkeit von den untersuchten Zellarten. Dabei ist das Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis in den Membranfraktionen aus adulten Rattenneuronen am höchsten. Der Cholesterolgehalt von embryonalen Neuronen und nicht neuronalen bzw. neuroendokrinen Zellen ist insgesamt deutlich geringer als in adulten Neuronen (*Abb. nicht gezeigt*).

Die CHOp38-Zellen sind also eher als ein Modell der zellulären Verhältnisse unreifer Neuronen zu betrachten. Ebenso können die Membranverhältnisse in PC12-Zellen als ein Modell für das Verhalten von Synaptophysin und weiteren synaptischen Proteinen in embryonalen Neuronen dienen. Diese beiden Zelllinien konnten dabei nicht auf Eigenschaften des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes untersucht werden, sondern dienten nur der Analyse der einzelnen Proteine und ihrem Verhalten innerhalb der Membran.

Die geringe Cholesterolversorgung der embryonalen Neuronen bewirkt zusätzlich einen verminderten Gehalt an synaptischen Vesikeln, in deren Membranen sich auch weniger cholesterolabhängige Nanodomänen ausbilden. Dies könnte ein zusätzlicher Grund für die fehlende Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in unreifen Neuronen sein. Die entwicklungsabhängige Umverteilung der Protein-Lipid-Verhältnisse innerhalb der Membranen ermöglicht wahrscheinlich erst nach ausreichender Cholesterolanreicherung der synaptischen Vesikelmembran mit zusätzlicher Organisation in Membransubdomänen die Fusion des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in adulten Neuronen.

4.3.2 Der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex nach Cholesterolverminderung

Der Cholesterolgehalt der Zellen wurde in dieser Arbeit auf drei unterschiedliche Weisen vermindert. (i) Durch Filipin und Methyl- β -cyclodextrin wird Cholesterol der Membran direkt entzogen, wohingegen Cholesteroloxidase das Cholesterol nur chemisch verändert und in der Membran belässt. Dabei beeinflusst Methyl- β -cyclodextrin die Membranfluidität sehr stark (Gimpl et al., 1997), Filipin und Cholesteroloxidase erhalten jedoch weitgehend den

physikalischen Zustand der Membran. (ii) Durch Lovastatin wird die zelluläre Cholesterolsynthese blockiert und damit die Versorgung der gesamten Zelle mit Cholesterol eingeschränkt. (iii) In einem dritten Ansatz wurde der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in Neuronen aus Niemann-Pick C1 Mäusen untersucht, in denen die zelluläre Cholesterolverteilung innerhalb des endozytotischen Transportweges auf Grund einer Mutation gestört ist.

Eine weitreichende Cholesterolverminderung der zellulären Membranen im Experiment ist schwer zu erreichen. Die Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in der die Moleküle miteinander in Wechselwirkungen stehen. Bei der Verminderung des membranären Cholesterols kann nicht sicher nachgewiesen werden, dass die äußere und die innere Lipidschicht in gleicher Weise durch die verwendeten cholesterolvermindernden Substanzen beeinflusst werden. Für eine Betrachtung, die sich auf das Verhalten des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes und auch des SNARE-Komplexes konzentriert, scheint die hier erreichte Cholesterolsenkung jedoch auszureichen. Als Kontrolle der verschiedenen Inkubationsergebnisse können die Untersuchungen an Niemann-Pick Mäusen des dritten Ansatzes dienen.

4.3.2.1 Direkter Cholesterolentzug der Membran

Synaptophysin ist gut löslich in Triton X-100. Seine Extrahierbarkeit nimmt jedoch nach Verminderung des Cholesterolgehaltes der zellulären Membranen von CHO₃₈-Zellen und PC12-Zellen mittels Filipin und Methyl- β -cyclodextrin deutlich ab. Synaptophysin verhält sich damit gegensätzlich zu vielen anderen cholesterolassoziierten Plasmamembranproteinen, wie z.B. Caveolin (Smart et al., 1994), Hämagglutinin (Keller und Simon et al., 1998) und GPI-verankerte Proteine (Ilangumaran et al., 1998), deren Extrahierbarkeit nach membranärer Cholesterolverminderung ansteigt. Durch den Entzug von Cholesterol könnte eine Auflösung der Lipidnanodomänen in der Vesikelmembran, mit denen Synaptophysin spezifisch assoziiert, bewirkt werden. Die neue Ordnung der Membran führt dann zu einer verstärkten Zusammenlagerung der Synaptophysinmoleküle zu Aggregaten, welche stärker in der Membran verankert sind und durch Triton X-100 nicht mehr herausgelöst werden können.

Die Interaktion der beiden Vesikelproteine nimmt nach Cholesterolverminderung neuronaler Zellmembranen deutlich ab, obwohl die Proteine weiterhin in der Membran vorhanden sind. Dabei zeigte die Abnahme der Komplexbildung eine Konzentrationsabhängigkeit für das Ausmaß der β -MCD-vermittelten Cholesterolverminderung. Die verminderte Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in Abhängigkeit vom membranären Cholesterolgehalt konnte sowohl nach chemischer

Quervernetzung als auch nach Immunpräzipitation beobachtet werden und beruht damit nicht nur auf der verminderten Extraktion von Synaptophysin vor der Immunpräzipitation.

Im Cholesteroxidase/Sphingomyelinase-Ansatz ergab sich nach Darstellung durch chemische Quervernetzung eine Zunahme des Komplexes und seiner einzelnen Proteine, jedoch eine Abnahme des Komplexes nach Immunpräzipitation. Für diese spiegelbildlichen Veränderungen können drei verschiedene Hypothesen formuliert werden. (a) Cholesteroxidase oxidiert den zugänglichen Anteil an Cholesterol zu 4-Cholesten-3-on. Dabei wird das Cholesterolmolekül nur modifiziert aber nicht aus der Membran entfernt. Die Gegenwart von oxidiertem Cholesterol könnte dann eine verstärkte Komplexierung von Synaptophysin mit Synaptobrevin bewirken. Durch die membranären Veränderungen sind jedoch die einzelnen synaptischen Proteine schlechter mit Triton X-100 aus der Membran herauszulösen, so dass nach Immunpräzipitation weniger Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex detektiert werden kann. (b) Zweitens lässt sich die Hypothese formulieren, dass dieses chemisch modifizierte Cholesterol in den Nanodomänen der vesikulären Membranen eine stärkere Anreicherung der synaptischen Vesikelproteine bewirkt, welche dann leichter durch DSS vernetzt würden. Gleichzeitig führt jedoch die oxidierende Wirkung der Cholesteroxidase zu einer Veränderung des Redoxpotentials des stark redoxempfindlichen Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes, was zu einer geringeren Menge immunpräzipitierbarer Komplexe führt. (c) Zur Unterstützung der Wirkung der Cholesteroxidase wurde Sphingomyelinase dem Ansatz zugegeben, welche ebenfalls zu Veränderungen des Lipidmilieus der Membran führen kann. Sphingomyelin ist ein wichtiger struktureller und funktioneller Bestandteil zellulärer Membranen. Sphingomyelin und Cholesterol sind kolokalisiert, und eine Verminderung des Sphingomyelingehaltes der Plasmamembran führt zu einer Veränderung der zellulären Cholesterolverteilung (Leppimäki et al., 1998). Somit ist auch die Möglichkeit zu erwägen, dass die beobachteten Veränderungen nach Cholesteroxidase/Sphingomyelinase-Inkubation teilweise auf der Wirkung der Sphingomyelinase beruhen.

4.3.2.2 Hemmung der Cholesterolsynthese

Die Inkubation von Hippokampuszellkulturen mit Lovastatin blockiert nicht nur die Cholesterolsynthese in den Hippokampusneuronen, sondern auch in den kokultivierten Gliazellen. Besonders Astrozyten tragen durch die Freisetzung von Cholesterol im Zentralnervensystem wie auch in der Zellkultur zur synaptischen Stabilität bei (Barres und Smith et al., 2001, Mauch et al., 2001, Ullian et al., 2001). Somit wurde der Cholesterolbedarf der mit Lovastatin inkubierten Hippokampusneuronen nur durch die zelleigenen

Cholesterolspeicher versorgt, bis diese aufgebraucht waren und die Zellen schließlich in einen Mangelzustand an Cholesterol übergangen. Auch in diesem Ansatz führte die membranäre Cholesterolverminderung zu einer Abnahme des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes auf der Vesikelmembran. Damit werden die Ergebnisse der β -MCD-Inkubation bestätigt.

4.3.2.3 Das Niemann-Pick C1-Mausmodell

Die Auswirkungen der Genmutation im cholesteroltransportierenden NPC1-Protein in Niemann-Pick Mäusen führte in dieser Arbeit zu einer verminderten Bildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes. Gleichzeitig zeigte sich eine leichte Abnahme der synaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptobrevin in der Vesikelmembran, was in geringem Maße auch nach Behandlung mit Methyl- β -cyclodextrin sichtbar wurde.

Die Auswirkungen und Veränderungen der Mutation im NPC1-Gen waren nur bei den homozygoten Mausmutanten sichtbar, nicht bei den heterozygoten. Es müssen folglich beide Allele modifiziert sein, um den zellulären Cholesterolgehalt ausreichend in einer Weise zu verändern, dass eine Beeinflussung der synaptischen Vesikelproteine und des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes nachweisbar ist. Wahrscheinlich wird der Cholesterolgehalt der Vesikelmembran erst bei den Homozygoten so deutlich vermindert, dass die Interaktion von Synaptophysin mit Synaptobrevin gestört wird.

4.4 Die Assoziation von Synaptophysin mit Cholesterol innerhalb von Nanodomänen der Vesikelmembran ist eine Voraussetzung für die Interaktion der synaptischen Vesikelproteine

Für die Ausbildung des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes spielt also die Assoziation von Synaptophysin mit Cholesterol eine entscheidende Rolle. Dabei sind zwei Funktionen der Interaktion zu unterscheiden. (i) Das membranäre Cholesterol reguliert wahrscheinlich die gerichtete Anordnung der Proteine in den Membranen zur Ermöglichung der Proteininteraktionen. Die beiden synaptischen Proteine Synaptophysin und Synaptobrevin werden in den Nanodomänen der Vesikelmembran durch Cholesterol in enger Nachbarschaft so angeordnet, dass sie miteinander agieren und hauptsächlich an der der Plasmamembran zugewandten Seite einen Komplex bilden können. Dadurch wird die besonders schnelle Verfügbarkeit von Synaptobrevin für die Bildung des SNARE-Komplexes während hoher synaptischer Aktivität unterstützt. (ii) Weiterhin könnte Synaptophysin durch seine Cholesterolbindung und Einlagerung in cholesterolhaltige Nanodomänen innerhalb der Vesikelmembran entscheidend am Aufbau und der Erhaltung des sehr hohen Krümmungsgrades der synaptischen Vesikel beteiligt sein.

Es wurde mit dieser Arbeit zum ersten Mal eine Cholesterolabhängigkeit des Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplexes in Neuronen aus Rattengehirngewebe nachgewiesen, nachdem Synaptophysin als cholesterolbindendes Protein bisher in PC12-Zellen und Neuronen adulter Ratten untersucht wurde (Huttner et al., 2000). Die Assoziation von Synaptophysin mit Cholesterol in Membransubdomänen ist damit kein einzelnes Phänomen neuronaler Zellmodelle, sondern tritt ebenso in ausgereiften Neuronen auf.

In weiterführenden Experimenten wäre es interessant zu analysieren, in welchem Ausmaß der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex in mit Cholesterol angereicherten synaptischen Vesikelmembranen gebildet wird und in wieweit die Extrahierbarkeit von Synaptophysin unter diesen Bedingungen möglicherweise ansteigt.

5 Literaturverzeichnis

- Ahnert-Hilger, G. und Bigalke, H. (1995) Molecular aspects of Tetanus and Botulinum Neurotoxin Poisoning. *Prog. in Neurobiol.*, **46**, 83-96.
- Ahmed, S.N., Brown, D.A. und London, E. (1997) On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes. *Biochem.*, **36**, 10944-10953.
- Arikawa, K., Molday, L.L., Molday, R.S., Williams, D.S. (1992) Localisation of peripherin/rds in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration. *J. Cell Biol.*, **116**, 659- 667.
- Barres, B.A. und Smith, S.J. (2001) Cholesterol – Making or Breaking the Synapse. *Science*, **294**, 1296-1297.
- Barnstable, C.J., Hofstein, R., Akagawa, K. (1985) A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Dev. Brain Res.*, **20**, 286-290.
- Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Margittai, M., Jahn, R., Ahnert-Hilger, G. (1999) The synaptophysin-synaptobrevin-complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.*, **19**, 1922-1931.
- Becher, A., Drenckhahn, A., Pahner, I., Ahnert-Hilger, G. (1999) The synaptophysin-synaptobrevin-complex is developmentally upregulated in cultivated neurons but is absent in neuroendocrine cells. *Europ. J. Cell*, **78**, pp 650-656.
- Bennett, M.K., Calakos, N., Scheller, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, **257**, 255-259.
- Brown, D.A. and London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 111-36.
- Brown, D.A. and London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17221-17224.
- Calakos, N., Bennett, M.K., und Scheller, R.H. (1994) Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. *Science*, **263**, 1146-1149.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cumming, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B. (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, **277**, 228-231.
- Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D., Gould, G.W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis. *PNAS*, **98**, 5619-5624.

-
- Chapman, E.R., An, S., Barton, N., und Jahn, R. (1994) SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27427-27432.
- Connell, G.J. und Molday, R.S. (1990) Molecular cloning, primary structure and orientation of the vertebrate photoreceptor cell protein Peripherin in the rod outer segment disk membrane. *Biochem.*, **29**, 4691-4698.
- Cremona, O. und de Camilli, P. (1997) Synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**, 323-330.
- Cruzeiro-Hansson, L., Ipsen, J.H. und Mouritsen, O.G. (1989) Intrinsic molecules in lipid membranes change the lipid-domain interfacial area: cholesterol at domain interfaces. *Biochem. Biophys. Acta*, **979**, 166-176.
- Edelmann, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., and Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to Synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.*, **14**, 224-231.
- Edwards, R.H. (1992) The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2**, 586-594.
- Elferink, L.A., Trimble, W.S., Scheller, R.H. (1998) Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in rat central nervous system. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11061-11064.
- Eshkind, L.E., und Leube, R.E. (1995) Mice lacking Synaptophysin reproduce and form typical synaptic vesicles. *Cell Tissue Res.*, **282**, 423-433.
- Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R., und Brünger, A.T. (1997) A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4528-4590.
- Frontali, N., Ceccarelli, B., Gorio, A., Mauro, A., Siekevitz, P., Tzeng, M.-C. and Hurlbeut, W.P. (1976) Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, **68**, 462-479.
- Galli, T., Garcia, E.P., Mundigl, O., Chilcote, T.J., De Camilli, P. (1995) V- and t-SNAREs in neuronal exocytosis: a need for additional components to define sites of release. *Neuropharmacology*, **43**, 1351-1360.
- Garcia, E.P., McPherson, P.S., Chilcote, T.J., Takei, K. und De Camilli, P. (1995) rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J. Cell Biol.*, **129**, 105-120.
- Ge, M., Field, K.A., Aneja, R., Holowka, D., Baird, B., Freed, J.H. (1999) Electron spin resonance characterization of liquid ordered phase of detergent-resistant membranes from RBL-2H3 cells. *Biophys. J.*, **77**, 925-933.
- Gimpl, G., Burger, K., Fahrenholz, F. (1997) Cholesterol as Modulator of Receptor Function. *Biochem.*, **36**, 10959-10974.

-
- Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Janh, R., Heuser, J.E. (1997) Structure and conformational changes in NSF and in its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, **90**, 523-535.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C., und Niemann, H. (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.*, **13**, 5051-5061.
- Hinz, B., Mitter, D., Becher, A., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A., Ahnert-Hilger, G. (2000) Is the synaptophysin/synaptobrevin-complex relevant for synaptic plasticity? *Xth Magdeburg International neurobiological Symposium: Mechanisms of Learning and Memory*.
- Hinz, B., Becher, A., Mitter, D., Schulze, K., Heinemann, U., Draguhn, A., Ahnert-Hilger, G. (2001) Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Europ. J. Cell Biol.*, **80**, 615-619.
- Hurlbut, W.P., Chieriegatti, E., Valtorta, F. and Haimann, C. (1994) Alpha-Latrotoxin channels in neuroblastoma cells. *J. Membr. Biol.*, **138**, 91-102.
- Huttner, W.B. (1983) Synapsin I, a nerve terminal-specific phosphoprotein. *J. Cell Biol.*, **96**, 1374-1388.
- Höltje, M., von Jagow, B., Pahner, I., Lautenschlager, M., Hörtnagl, H., Nürnberg, B., Jahn, R., und Ahnert-Hilger, G. (2000) The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go2. *J. Neurosci.*, **20**, 2131-2141.
- Ilangumaran, S. and Hoessli, D.C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.*, **335**, 433-440.
- Incardano, J.P., Eaton, S. (2000) Cholesterol in signal transduction. *Cell Biol.*, **12**, 193-203.
- Jahn, R., Südhof, T.C. (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. *Ann. Rev. Neurosci.*, **17**, 219-246.
- Jahn, R., Südhof, T.C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Ann. Rev. Biochem.*, **68**, 219-246.
- Janz, R., Südhof, T.C., Hammer, R.E., Unni, V., Siegelbaum, S.A., Bolshakov, V.Y. (1999) Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron*, **24**, 687-700.
- Johnston, P.A., Jahn, R., Südhof, T.C. (1989) Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1268-1273.
- Kee, Y., Lin, R.C., Hsu, S.C., und Scheller, R.H. (1995) Distinct Domains of Syntaxin are Required for Synaptic Vesicle Fusion Complex Formation and Dissociation. *Neuron*, **14**, 991-998.
- Keller, P. und Simons, K. (1998) Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.*, **140**, 1357-1367.

- Khvotchev, M. und Südhof, T.C. (2000) Alpha-Latrotoxin triggers transmitter release via direct insertion into the presynaptic plasma terminal. *EMBO J.*, **19**, 3250-3262.
- Kobayashi, T., Beuchat, M.L., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R.G., Gruenberg, J. (1999) Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biol.*, **1**, 113-118.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. und Jahn, R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.*, **20**, 2202-2231.
- Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B.V., und Steck, T.L. (1989) Plasmamembranes contain half the phospholipids and 90 % of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3786-3793.
- Leppimäki, P., Kronqvist, R. und Slotter, P. (1998) The rate of sphingomyelin synthesis de novo by level of cholesterol in cultured human skin fibroblasts. *Biochem. J.*, **335**, 285-291.
- Leube, R.E., Kaiser, P., Seiter, A., Zimbelmann, R., Franke, W.W., Rehm, H., Knaus, P., Prior, P., Betz, H., Reinke, H., Beyreuther, K., Wiedemann, B. (1987) Synaptophysin: molecular organisation and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *EMBO J.*, **6**, 3261-3268.
- Leube, R.E., Wiedemann, B., Franke, W.W. (1989) Topogenesis and sorting of synaptophysin: synthesis of a synaptic vesicle protein from a gene transfected into nonneuroendocrine cells. *Cell*, **59**, 13488-13492.
- Leveque, C., Pupier, S., Marqueze, B., Geslin, L., Kataoka, M., Takahashi, M., De Waard, M., Seagar, M. (1998) Interaction of cysteine string proteins with the $\alpha 1A$ subunit of the P/Q-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13488-13492.
- Lin, R.C., Scheller, R.H. (2000) Mechanism of synaptic vesicle exocytosis *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 19-46.
- Liscum, L. und Munn, N.J. (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochem. Biophys. Acta*, **1438**, 19-37.
- Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A., Tagle, D.A. (1997) Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science*, **277**, 232-235.
- Martin, T.F.J. (2000) Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nature Cell Biol.*, **2**, E9-E11.
- Mauch, D.H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E., Otto, A., Pfrieder, F.W. (2001) CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science*, **294**, 1354-1357.

- McMahon, H.T., Ushkaryov, Y.A., Edelman, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R., Südhof, T.C. (1993) Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature*, **364**, 346-349.
- Mollinedo, F. und Lazo, P.A. (1997) Identification of two isoforms of the vesicle-membrane fusion protein SNAP-23 in human neutrophils and HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **231**, 808-812.
- Montine, T.J., Montine, K.S., and Swift, L.L. (1997) Central nervous system lipoproteins in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, **151**, 1571-1575.
- Mukherjee, S. and Maxfield, F.R. (1999) Cholesterol: stuck in traffic. *Nature Cell Biol.*, **1**, E37-E38.
- Murthy, V.N. und Stevens, C.F. (1998) Synaptic vesicles retain their identity through the endocytotic cycle. *Nature*, **392**, 497-501.
- Neufeld, E.B., Wastrey, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A.M., Dwyer, N.K., Roff, C.F., Ohno, K., Morris, J.A., Carstea, E.D. (1999) The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9627-9635.
- Niemann, H., Blasi, J. und Jahn, R. (1994) Clostridial neurotoxins: New tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.*, **4**, 179-185.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing 'preassembled signaling complexes' at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5419-5422.
- Otto, H., Hanson, P.I., Jahn, R. (1997) Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **19**, 6197-6201.
- Ovchinnikov, Y.A., Abdulaev, N.G., Zolotarev, A.S., Artamonov, I.D., Bessalov, I.A., Dergachev, A.E., Tsuda, M. (1988) Octopus rhodopsin: amino acid sequence deduced from cDNA. *FEBS Lett.*, **232**, 69-72.
- Pang, L., Graziano, M.M. and Wang, S. (1999) Membrane Cholesterol Modulates Galanin-GalR2 Interaction. *Biochem.*, **38**, 12003-12011.
- Pevsner, J., Hsu, S.C., Braun, J.E., Calakos, N., Ting, A.E., Bennett, M.K., und Scheller, R.H. (1994) Specificity and Regulation of a Synaptic Vesicle Docking Complex. *Neuron*, **13**, 353-361.
- Ravichandran, V., Chawla, A., Roche, P.A. (1996) Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP binding-protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissue. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13300-13303.
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55-63.
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A. und Anderson, R.G.W. (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell. Biol.*, **111**, 2931-2938.

- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, B., Parton, R.G. (1999) Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 98-105.
- Röper, K., Corbeil, D., Huttner, W.B. (2000) Retention of Promininin microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biol.*, **2**, 582-592.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E. und Allard, J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.*, **127**, 1217-1232.
- Sheets, E.D., Holowka, D., Baird, B. (1999) Membrane organization in immunoglobulin E receptor signalling. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 95-99.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Spiwoks-Becker, I., Vollrath, L., Seeliger, M.W., Jaissle, G., Eshkind, L.G. und Leube, R.E. (2001) Synaptic vesicle alterations in Rod Photoreceptors of Synaptophysin-deficient mice. *Neuroscience*, **107**, 127-142.
- Simons, K. und van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochem.*, **27**, 6197-6202.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using biochonic acid. *Anal Biochem.*, **150**, 76-85.
- Söllner, T., Bennet, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. und Rothman, J.E. (1993) A Protein Assembly-disassembly Pathway In Vitro That May Correspond to Sequential Steps of Synaptic Vesicle Docking, Activation, and Fusion. *Cell*, **75**, 409-418.
- Südhof, T.C., Baumert, M., Perin, M.S., Jahn, R. (1998) A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to Drosophila. *Neuron*, **2**, 1475-1481.
- Sugita, S., Janz, R., Südhof, T.C. (1999) Synaptobrevins regulate Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18893-18901.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., Huttner, W.B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nature Cell Biol.*, **2**, 42-49.
- Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W.W., Betz, H. (1988) Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science*, **242**, 1050-1053.
- Trimble, W.S., Cowan, D.M., Scheller, R.H. (1988) VAMP-1: A synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, pp 4538-4542.
- Ullian, E.M., Saperstein, S., Christopherson, K.S., Barres, B.A. (2001) Control of Synapse Number by Glia. *Science*, **291**, pp 657-661.

- Veit, M., Becher, A., Ahnert-Hilger, G. (2000) Synaptobrevin 2 is palmitoylated in synaptic vesicles prepared from adult, but not from embryonic brain. *Mol. Cell Neuroscience*, **15**, 408-416.
- Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E.R., Fischer von Mollare, G. und Jahn, R. (1995) The t-SNAREs Syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.*, **128**, 637-645.
- Wanke, E., Ferroni, A., Gattanini, P. and Meldolesi, J. (1986) Alpha-Latrotoxin of the black widow spider venom opens a small, non-closing cation channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 320-324.
- Wiedemann, B. und Franke, W.W. (1985) Identification and localisation of synaptophysin: An integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, **41**, 1017-1028.
- Wu, L.G. und Borst, J.G. (1999) The reduces release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron*, **23**, 821-832.
- Yoshida, A., Oho, C., Omori, A., Südhof, T.C., Anderson, R.G.W. (1994) HPC-1 is associated with synaptotagmin and ω -conotoxin receptor. *Cell*, **78**, 751-760.
- Zenisek, D., Steyer, J.A. und Almers, W. (2000) Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature*, **406**, 849-854.
- Zucker, R.S. (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron*, **17**, 1049-1055.

6 Lebenslauf

Diana Mitter, geboren am 15. November 1976 in Weimar

Schul Ausbildung:

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| 09/1983 – 07/1991 | Goethe-Oberschule, Weimar |
| 09/1991 – 06/1995 | Friedrich-Schiller-Gymnasium, Weimar |
| 06/1995 | Abitur |

Studium:

| | |
|-------------------|--|
| 10/1996 – lfd. | Humanmedizinstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin |
| 09/1998 | Ärztliche Vorprüfung |
| 10/1999 – 03/2000 | Forschungssemester |
| 03/2000 | 1 Staatsexamen |
| 03/2001 – 04/2001 | Forschungsaufenthalt am Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, Madrid/Spanien |
| 10/2001 – 02/2002 | Auslandsstudium an der Universität van Amsterdam |

Stipendium:

| | |
|-------------------|--|
| 01/2000 – 12/2000 | Forschungsstipendium der Charité im Rahmen des Projektes: Biogenese sekretorischer Vesikel |
| 04/2000 – lfd. | Friedrich-Ebert-Stiftung |

Dissertation:

| | |
|-------------------|--|
| 03/1999 – 03/2001 | in der Arbeitsgruppe experimentelle Elektronenmikroskopie und Neuroanatomie von Prof. Dr. Gudrun Ahnert-Hilger, Institut für Anatomie, Charité, Berlin |
|-------------------|--|

7 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, **Diana Mitter**, geboren am **15.11.1976** in Weimar, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 26.04.2002

Diana Mitter.